

TARTU ÜLIKOOL  
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

RUTT LILLEOJA

**LIPOPOLÜSAHHARIIDI JA INTERLEUKIIN-2 TOIME HIIRE CD4+CD25+ JA  
CD4+CD25- RAKKUDELE**

MAGISTRITÖÖ

Juhendaja:  
*Ade Kallas, farmaatsiadoktor*

TARTU 2007

# Sisukord

Sisukord .....	2
Lühendid .....	4
Sissejuhatus .....	5
1. Kirjanduse ülevaade .....	6
1.1 Regulaatorsed T rakud .....	6
1.2 Treg rakkude poolt vahendatud supressiooni mehhanismid .....	8
1.3 CD4+CD25+ T reguleerivate rakkude fenotüüp .....	10
1.3.1 Tsütotoksilise T lümfotsüüdi antigeen-4 .....	11
1.3.2. Glükokortikoid-indutseeritud TNF retseptor .....	12
1.3.3. Kemokiini retseptorid .....	12
1.3.4. Transkriptsioonifaktor Foxp3 .....	14
1.3.5 Toll-retseptori sarnased retseptorid .....	16
1.3.5.1 TLR4 retseptori ligand lipopolüsahhariid .....	18
2. Töö eesmärgid .....	20
3. Eksperimentaalne osa .....	21
3.1. Materjalid ja meetodid .....	21
3.1.1. Reagendid .....	21
3.1.2. Hiire põrnarakkudest lümfotsüütide eraldamine .....	22
3.1.3. CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude eraldamine .....	22
3.1.4. Rakkude proliferatsiooni määramine MTT meetodil .....	23
3.1.5. Rakkude märgistamine läbivoolu tsütomeetril analüüsimiseks .....	23
3.1.6. LPS mõju hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütidele .....	24
3.1.7. LPS mõju hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütide proliferatsioonile .....	24
3.1.8. Foxp3 ekspressiooni määramine CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudes .....	25
3.1.9. Statistiline analüüs .....	25
3.2. Tulemused .....	26
3.2.1. LPS toime põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütidele .....	26
3.2.2. LPS erinevate kontsentratsioonide toime põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütidele .....	28

3.2.3. LPS toime hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütide proliferatsioonile .....	29
3.2.4. Hiire põrnarakkude sorteerimisel saadud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakupopulatsioonid .....	31
3.2.5. CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakupopulatsioonide elulemus .....	31
3.2.6. TCR stimuleerimise ja CD28 kostimulatsiooni mõju CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudele .....	32
3.2.7. LPS mõju CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudele.....	35
3.2.8. TGF- $\beta$ mõju CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudele.....	37
4. Arutelu .....	39
Kokkuvõte .....	43
Summary .....	45
Kirjandus .....	47
Tänuavaldused.....	53

## Lühendid

7-AAD- 7-amino-aktinomütsiin D  
APC konjugaat- allofükotsüaniin konjugaat  
APC rakud- antigeeni esitlevad rakud  
BSA- veise seerumalbumiin  
CCL-kemokiini ligand  
CCR- kemokiinireseptor  
CD- diferentseerumise klaster  
CTLA-4- tsütotoksilise T lümfotsüüdi antigeen 4  
CXCL-kemokiini (C-X-C motiiviga) ligand  
CXCR- kemokiini (C-X-C motiiviga) retseptor  
d3Tx- kolmandal päeval teostatud tümektoomia  
EDTA- etüleen-diamiin tetraatsetaat hape  
FITC- fluorestseiin-5-isotiotsüanaat  
Foxp3- *forkhead box P3*, *forkhead/winged-helix* perekonda kuuluv transkriptsioonifaktor  
GITR- glükokortikoid indutseeritud TNFR retseptor  
GPI- glükosüülfosfatidüül inositol ankur  
HEPES- N-(2-hüdroksüetüül)piperasiin-N'(2-etaansulfoon hape)  
IL- interleukiin  
IL-2R $\alpha/\beta$ - interleukiin 2 retseptor  $\alpha/\beta$ -ahel  
kDa- kilodalton  
LAP- TGF- $\beta$  latentsusega seotud valk  
LBP- LPS siduv valk  
LPS- lipopolüsahhariid  
MHC- peamine koesobivus-kompleks  
MIP- makrofaagide põletikuline valk  
MTT- 3-(4,5-dimetüül-2-tiasolüül)-2,5-difenüül-2H tetrasoolium bromiid  
NK- loomulikud tapjarakud  
NLS- tuuma lokalisatsiooni signaal  
PAMP- patogeenidega seotud molekulaarsed mustrid  
PBS- fosfaatpuhverdatud soolalahus  
PE- fukoerütriin  
rTGF $\beta$ - rekombinantne TGF $\beta$   
SDS- naatriumdodetsüülsulfaat  
TCR- T raku-retseptor  
TGF $\beta$ - transformeeriv kasvufaktor  $\beta$   
TLR- Toll'i sarnased retseptorid  
TNF- kasvaja nekroosifaktor  
TNFR- kasvaja nekroosifaktori retseptor  
Treg- CD4+CD25+ reguloorsed T rakud

## Sissejuhatus

Esimest korda kirjeldati T rakkude vahendatud autoimmunhaiguse supressiooni juba enam kui 30 aastat tagasi kui Nishizuka ja Sakakura leidsid, et kolmandal päeval teostatud tümektoomia (d3Tx) põhjustab hiirtel organ-spetsiifilise autoimmuunsuse (Nishizuka & Sakakura, 1969). Sellisel viisil põhjustatud autoimmuunsust saab vältida, kui d3Tx hiirtele süstida tüümuse eemaldamisele järgnevatel päevadel CD4+CD25+ rakke (Asano et al., 1996, Sakaguchi et al., 1995). Sellised T rakud nimetati esialgu supressor T rakkudeks ning arvati, et tegemist on spetsialiseerunud rakupopulatsiooniga, mis vahendab oma toimet antigeeni spetsiifilisi faktoreid sekreteerides (Gershon & Kondo 1971). Hiljem nimetati CD4+CD25+ rakud ümber reguleerivateks T rakkudeks (Treg).

Sarnaselt kõigile T rakkudele arenevad Treg rakud tüümuses. Treg rakkude T raku-retseptori repertuaari varieeruvus on võrreldav T efektorrakkudega, kuid on suunatud organismi-omaste peptiidide vastu (Kasow et al., 2004).

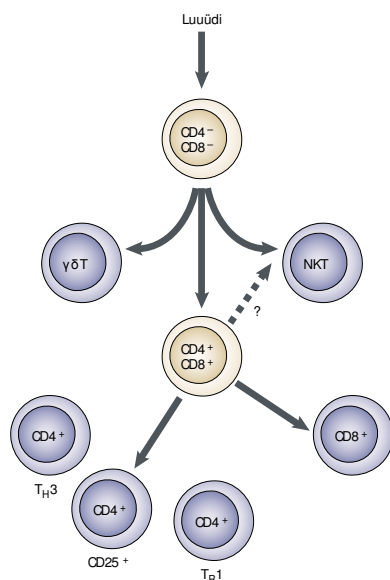
*Toll*'i sarnased retseptorid (TLR) tunnevad ära mikroobidega seotud molekulaarseid mustreid ning algatavad seejärel immuunvastuse. TLR retseptorid stimuleerivad kaasasündinud immuunsuses osalevaid rakke nagu makrofaage, dendriittrake ning aktiveerivad omandatud immuunvastuse antigeeni presenteerivate rakkude (APC) kaudu. Viimastel aastatel on leitud TLR retseptorite ekspressioon T ja B rakkude pinnal, lisaks sellele ka Treg rakkude pinnal (Caramalho et al., 2003, Hornung et al., 2002). TLR retseptorite olemasolu Treg pinnal võimaldab kiire ning vahetu reaktsiooni patogeenidele. Treg rakkudele on spetsiifiline TLR retseptori TLR4 ekspressioon, mis tunneb ära Gram-negatiivsete bakterite välismembraani koostisesse kuuluva lipopolüsahhariidi (LPS).

Antud töö teoreetilises osas antakse ülevaade Treg rakkudest, nende poolt vahendatud supressioonimehhanismidest ning TLR retseptorite olulisusest Treg rakkudele. Töö praktilises osas uuriti LPS ning tsütokiinide TGF- $\beta$  ja IL-2 toimet CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudele.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1. 1 Regulaatorsed T rakud

Regulaatorsed T rakud (Treg) taasavastati 1990-ndate keskel, kui näidati, et CD4+ rakud, mis ekspresseerivad oma pinnal IL-2 retseptori  $\alpha$ -ahelat (CD25) on võimelised supresseerima immuunvastust ning takistama autoimmuunhaiguste tekkimist (Sakaguchi et al., 1995). Viimaste aastate jooksul on lisaks CD4+CD25+ Treg rakkudele kirjeldatud mitmeid teisi supresseerivat aktiivsust omavaid T rakkude subpopulatsioone: erinevad CD4+ regulaatorsed rakud,  $\gamma\delta$  T rakud (ekspresseerivad rakupinnal tavapärase  $\alpha\beta$ -TCR, asemel  $\gamma\delta$ -TCR subühikuid), NKT (*natural killer T*) rakud ja CD8+ Treg (Joonis 1). CD4+ Treg rakkude hulgas eristatakse indutseeritud rakke ning naturaalselt esinevaid CD4+CD25+ regulaatorseid T rakke. Indutseeritud T rakud sekreteerivad tsütokiine IL-10 ja TGF- $\beta$  ning neid tähistatakse sageli T<sub>r</sub>1 (Levings et al., 2002) või T<sub>h</sub>3 rakkudena (Weiner 2001).



**Joonis 1.** Regulaatorsete T rakkude mitmekesisus. Joonisel on näidatud T rakkude eellarakud ning Treg rakud. (Bach 2003).

*In vivo* esinevaid CD4+CD25+ Treg rakke nimetatakse tavaliselt naturaalselt esinevateks Treg rakkudeks. Naturaalselt esinevad CD4+CD25+ Treg rakud ei ole kergesti stimuleeritavad, nad ei prolifereeru ning ei tooda või toodavad vähestes kogustes tsütokiine (Shevach 2002). Seega sõltuvad Treg rakud efektorrakkude poolt sünteesitavatest tsütokiinidest. Tsütokiinidest on olulisim IL-2. Hiirtel, kellel puudub IL-2, IL-2 retseptori  $\alpha$ -ahel (IL-2R $\alpha$ ) või IL-2R $\beta$ -ahel esineb väga vähe CD4+CD25+ Treg rakke ning neil esinevad tõsised autoimmuunhaigused (Almeida et al., 2002, Malek et al., 2002, Papiernik et al., 1998). IL-2 vajalikkus rakkude kasvu ja metabolismi reguleerivate geenide ekspressioonil näidati kasutades IL-2-/- ja IL-2R $\alpha$ -/- hiiri (Almeida et al., 2002). Vaatamata IL-2 puudumisele indutseeriti tümotsüütides Treg rakkude spetsiifilise transkriptsioonifaktori Foxp3 ekspressioon (Fontenot et al., 2005). CD4+CD25+ Treg *in vitro* uuringud näitavad, et IL-2 on vajalik nende rakkude supresseerivaks aktiivsuseks (Thornton et al., 2004). Hiire CD4+CD25+ Treg rakkude kasvatamisel CD3-spetsiifilise antikehaga kaetud koekultuuri plaatidel IL-2 puudumisel jääb ellu vaid väike osa algsest rakkude hulgast ning nende rakkude supresseeriv aktiivsus on tunduvalt väiksem kui IL-2 juuresolekul (Thornton et al., 2004).

CD4+CD25- rakkude aktiveerumiseks on vajalikud kaks signaali: TCR ja peptiid-MHC-kompleksi interaktsioon ning kostimulatoorne signaal antigeeni esitlevatelt (APC) rakkudelt. Esmane kostimulatoorne signaal edastatakse, kui CD28 seondub APC pinnal ekspresseeruvate CD80 või CD86 retseptoritega. CD4+CD25+ Treg rakkude homeostaasi ja supresseeriva aktiivsuse tekkimiseks vajalikud kostimulatsiooni tingimused ei ole veel selged. On näidatud, et CD4+CD25+ Treg rakkude normaalseks arenguks tüümuses on vajalik CD28 retseptori kostimulatsioon (Salomon et al., 2000). Tüümotsüütide CD28 kostimulatsioon on vajalik IL-2 tootmiseks, mis omakorda on vajalik Treg rakkude homeostaasil (Tai et al., 2005). Lisaks sellele on Treg rakkude arengul vajalik CD28 otsene kontakt diferentseeruvate tümotsüütidega (Tai et al., 2005). CD28 kostimulatsioon indutseerib Treg rakkude spetsiifilise transkriptsioonifaktor Foxp3 ekspressiooni ning GITR ja CTLA-4 ekspressiooni (Tai et al., 2005). CD28-/- hiirtel on leitud oluliselt vähenenud CD4+CD25+ Treg rakkude arv (Salomon et al., 2000, Tai et al., 2005). Samas ei ole CD28 kostimulatsioon tingimata vajalik Treg rakkude supresseeriva aktiivsuse tagamisel, sest CD4+CD25+ Treg rakud, mida stimuleeriti kas terve hiire APC rakkude või

APC rakkudega, mis olid saadud CD80<sup>-/-</sup> või CD86<sup>-/-</sup> hiirtelt, omasid kõik täielikku supresseerivat aktiivsust *in vitro* (Thornton et al., 2004).

## 1.2 Treg rakkude poolt vahendatud supressiooni mehhanismid

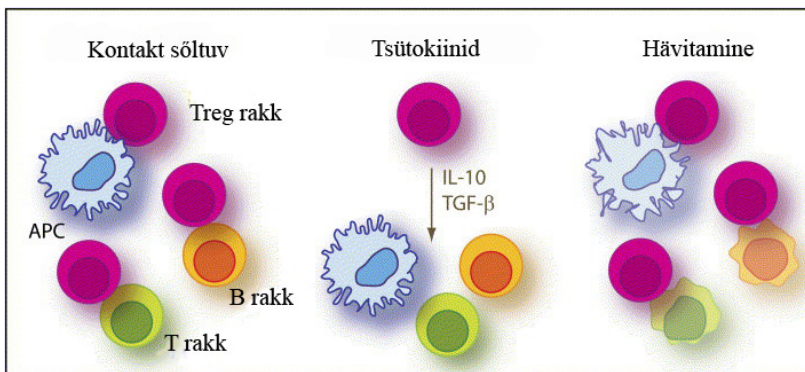
Kuidas täpselt Treg rakud suudavad supresseerida efektorrakke ei ole siiani veel teada. Enamustes *in vitro* teostatud inimese ja hiire Treg rakkude uuringute tulemustest näitab, et CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg rakud supresseerivad märklaud-rakke nn rakk-rakk kontaktist sõltuvalt, kuid tsütokiinidest sõltumatult (Joonis 2). Tsütokiinide IL-4, IL-10 või TGF- $\beta$  neutraliseerimine vastava antikehaga ei vähendanud CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg rakkude supresseerivat aktiivsust efektorrakkude suhtes (Thornton et al., 2004). Poolläbilaskva membraaniga eraldatud CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg rakud ei ole võimelised CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> märklaud-rakkude proliferatsiooni inhibeerima (Thornton & Shevach 1998). Seega võib arvata, et Treg rakkude supresseeriva aktiivsuse tagamiseks on vajalik mõni Treg pinnal ekspresseeruv molekul, mis vahendab supresseerivat signaali märklaud-rakule. Antud hetkel pole sellist pinnamolekuli veel leitud, kuigi üheks võimalikuks kandidaadiks on Treg rakkude pinnale seotud TGF- $\beta$  (Nakamura et al., 2004).

Samuti ei ole selge, kas Treg rakud supresseerivad märklaud-rakke olles otseses kontaktis T-efektorrakkudega või vahendavad nad oma inhibeerivat toimet APC rakkude, näiteks dendriitrakkude kaudu. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg rakkude paiknemise ja liikumise jälgimisel hiirte lümfisõlmedes näidati, et Treg rakud puutuvad väga vähe kokku CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-efektorrakkudega ning assotsieeruvad tugevalt hoopis dendriitrakkudega, mis esitlevad Treg rakkudele spetsiifilisi antigeene (Tang et al., 2006).

Treg rakkude supressioonil *in vivo* on lisaks rakkude vahelisele kontaktile kindlasti väga oluline osa ka tsütokiinidel (Joonis 2). TGF- $\beta$  on immuunosupressiivne tsütokiin, mida ekspresseeritakse Treg rakkude pinnal. TGF- $\beta$ -spetsiifilise antikeha lisamine Treg rakkudele põhjustab rakkude supresseerivate omaduste inhibeerimist (Nakamura et al., 2004). Samas omavad TGF- $\beta$ <sup>-/-</sup> hiirtelt eraldatud CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg rakud supresseerivat aktiivsust *in vitro* (Piccirillo et al., 2002). TGF- $\beta$  retseptori esinemine T efektorrakkudel ei



ole määrava tähtsusega, sest tervelt hiirelt eraldatud CD4+CD25+ Treg rakud olid võimelised inhibeerima proliferatsiooni T efektorrakkudel, millel puudus funktsionaalne TGF- $\beta$  retseptor (Piccirillo et al., 2002). Oluline roll on ka tsütokiinil IL-10, mis on vajalik Treg funktsiooni tagamisel mitmete autoimmuunhaiguste ärahoidmisel. Mudelsüsteemis, kus kasutati autoimmuunse kopsupõletikuga hiiri, suutsid antigeeni-spetsiifilised Treg rakud inhibeerida autoreaktiivseid T efektorrakke ning hoidsid ära haiguse kujunemise. Efektiivseks supressiooniks oli oluline nii Treg rakkude sama antigeenispetsiifilisus kui autoreaktiivsetel efektorrakkudel ning IL-10 ja TGF- $\beta$  juuresolek (Huang et al., 2005).



**Joonis 2.** Treg rakkude poolt vahendatud supressiooni võimalikud mehhanismid. Joonisel on toodud 3 arvatavat võimalust, kuidas Treg rakud supresseerivad erinevat tüüpi märklaud-rakke: T efektorrakke, APC rakke ja B rakke. Kaks mehhanismi hõlmavad märklaudrakkude otsest supressiooni ning kolmas on kaudne tsütokiinide poolt vahendatud supressioon (Shevach 2006).

Kuidas Treg rakud oma märklaud-rakkude signaaliülekannderadu mõjutavad ning supressiooni vahendavad ei ole veel teada. IL-2 produktsiooni inhibeerimine on kindlasti oluline (Thornton & Shevach 1998). CD4+CD25+ Treg rakud supresseerivad *in vitro* katsetes IL-2 mRNA transkriptsiooni, takistades sel viisil IL-2 produktsiooni, mis omakorda tekitab vaba IL-2 kontsentratsiooni vähenemise ning sellega kaasneb T rakkude proliferatsiooni vähenemine (Thornton & Shevach 1998). Kuna CD4+CD25+ Treg rakud ekspresseerivad kõrge afiinsusega IL-2 retseptorit (CD25), siis vähendavad Treg rakud vaba IL-2 kättesaadavust veelgi (de la Rosa et al., 2004). Kuid IL-2 produktsiooni inhibeerimine ei ole arvatavasti ainus supressioonimehhanism, kuna on näidatud, et CD4+CD25+ Treg rakud on võimelised maha suruma autoimmuunhaiguse kujunemist hiirtel, kelle T rakud ei ekspresseeri IL-2 retseptorit (Malek et al., 2002). CD4+CD25+ Treg rakud võivad supresseerivat aktiivsust vahendada ka rakke otseselt hävitades (Joonis

2). CD4+CD25+ Treg rakkude ning B rakkude ko-kultuuris on B rakkude proliferatsioon tugevalt supresseeritud (Zhao et al., 2006), kusjuures ilmnes B rakkude suurenenud suremus. B rakkude suremuse põhjustanud Treg rakkude uurimisel leiti nendes rakkudes perforiini ja gransüümide hulga suurenemine (Zhao et al., 2006).

### 1.3 CD4+CD25+ T regulatoorsete rakkude fenotüüp

Treg rakud ekspresseerivad konstitutiivselt IL-2 retseptori  $\alpha$ -ahelat (CD25). Kahjuks pole CD25 ekspressioon Treg rakkude spetsiifiline, kuna T rakkude aktiveerumisel toimub samuti CD25 ekspressiooni suurenemine. See on hästi detekteeritav inimese CD4+CD25+ Treg rakkude uurimisel (Baecher-Allan et al., 2001). Hiire CD4+CD25+ Treg rakud on CD4+CD25- populatsioonist kergesti eristatavad ning CD25+ rakud moodustavad 5-10 % perifeersetest CD4+ rakkudest. Ligikaudu 30 % inimese CD4+ rakkudest ekspresseerib CD25 pinnamarkerit. Suurem osa nendest rakkudest ekspresseerivad CD25 madalal või keskmisel (CD25<sup>int</sup>) tasemel ja kõrgel tasemel (CD25<sup>high</sup>) ekspresseerib CD25 molekuli vaid 1-3 % CD4+ rakkudest (Wing et al., 2002). Sorteeritud CD25<sup>int</sup> ja CD25<sup>high</sup> rakkudega läbi viidud *in vitro* uuringutes näidati, et regulatoorsed omadused on tegelikult ainult CD25<sup>high</sup> rakupopulatsioonil (Baecher-Allan et al., 2001).

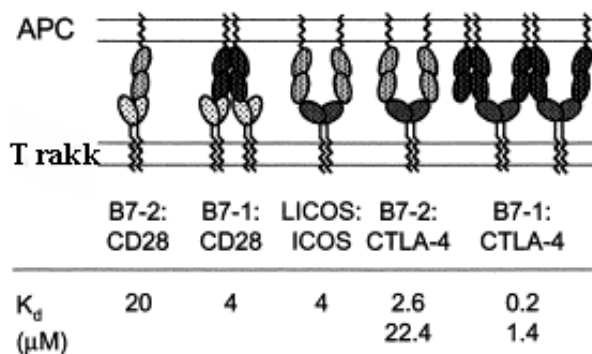
Kuna CD25 pole optimaalne marker Treg rakkude uurimisel, on mitmed töögrupid leidnud hulga teisi markereid, mida ekspresseeritakse CD4+CD25+ Treg rakkudel võrreldes CD4+CD25- rakkudega kõrgel tasemel:

- CTLA-4/CD152 (*cytotoxic T-lymphocyte associated molecule-4*) ja CD122 (IL-2 retseptori  $\beta$ -ahel) (Wing et al., 2002).
- GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor*) (Shimizu et al., 2002).
- Kemokiini retseptorid (Wei et al., 2006)
- Foxp3 (Brunkow et al., 2001)
- TLR (*Toll-like receptors*) (Caramalho et al., 2003)

### 1.3.1 Tsütotoksilise T lümfotsüüdi antigeen-4

Kostimulaatorse retseptori CD28 homolog tsütotoksilise T lümfotsüüdi antigeen-4 (CTLA-4), on üks enam uuritud immuunvastuse blokeerijatest. T raku immuunvastuse algatamisel on keskne roll CD28 ja B7 perekonna retseptorite (CD80/86) interaktsioonil. CTLA-4 ekspressioon indutseeritakse peale T raku aktivatsiooni ning CTLA-4 interaktsioon CD80/86 retseptoritega surub maha T raku vastuse. CTLA-4 inhibeerib T raku aktiveerimist ja IL-2 produktsiooni (Coenen et al., 2006). Andmed CTLA-4 vajalikkusest Treg rakkude supresseerivate omaduste vahendamisel on vastuolulised. On näidatud, et CTLA-4 vastaste antikehade lisamine hiire CD4+CD25- ja CD4+CD25+ rakkude ko-kultuurile neutraliseerib Treg rakkude inhibeeriva toime (Takahashi et al., 2000). Samas on leitud, et CD4+CD25+ Treg rakud omavad supresseerivaid omadusi hoolimata CTLA-4 blokeerimisest (Thornton et al., 2004).

Nii CD28 kui CTLA-4 on homodimeersed retseptorid, kuid nad seovad oma ligandi CD80 erineval moel. CD28 on monovalentne retseptor ning seob ühe CD80 molekuli. CTLA-4 seevastu on bivalentne ning seob kaks CD80 molekuli (Collins et al., 2002). CD80 on samuti bivalentne, seetõttu moodustab CTLA-4-CD80 kompleks väga stabiilse struktuuri (Joonis 3) ning täiendavat signaali ei vaja. CD28 monovalentsus on aga oluline füsioloogilise kostimulatsiooni tagamisel, sest CD28-CD80 kompleks pole piisavalt püsiv ning T raku aktiveerimiseks on vajalik lisaks TCR stimulatsioon (Dennehy et al., 2006).



**Joonis 3.** CD28, CTLA-4, ICOS ja B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), LICOS poolt vastavalt moodustuvate komplekside struktuurid. Joonisel on iga kompleksi all toodud ära vastav dissotsiatsioonikonstant (Collins et al., 2002).

### ***1.3.2. Glükokortikoid-indutseeritud TNF retseptor***

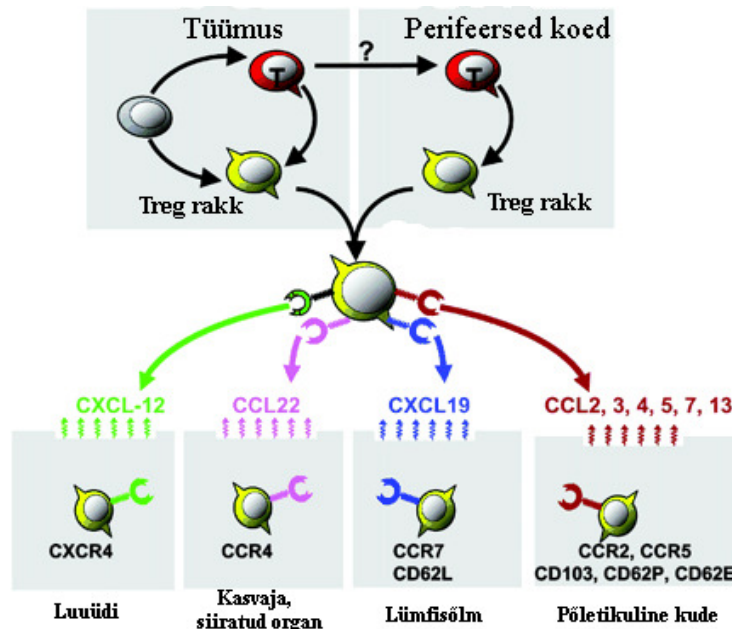
GITR kuulub kasvaja nekroosifaktori retseptorite (*tumour necrosis factor receptor*, TNFR) superperekonda (Shimizu et al., 2002). Koheselt isoleeritud hiire Treg rakud ekspresseerivad kõrgel tasemel GITR. CD4+CD25<sup>-</sup> T rakud, CD8<sup>+</sup> T rakud, B rakud, dendriitrakud ja makrofaagid ekspresseerivad GITR madalal tasemel, kuid GITR ekspressioonitase suureneb nende rakkude aktivatsioonil (Shimizu et al., 2002). On näidatud, et Foxp3 reguleerib GITR ekspressiooni (Khatti et al., 2003), mis viitab sellele, et GITR võiks olla Treg rakkude spetsiifiline marker ning osaleda nende poolt vahendatud supressioonil. Kuid mitmed uurimisgrupid väidavad vastupidist näidates, et CD4+CD25+GITR<sup>high</sup> T rakud ei oma supresseerivaid omadusi (Shimizu et al., 2002) ning GITR<sup>-/-</sup> hiire Treg rakud omavad vastupidiselt eeldatule supresseerivaid omadusi (Stephens et al., 2004). GITR blokeerimine võib inhibeerida Treg rakke või muuta T efektorrakke vähem tundlikuks Treg vahendatud supressioonile. GITR on koaktiveeriv retseptor ning mida enam aktiveerunud on T efektorrakud, seda vähem on nad tundlikud supressioonile (Stephens et al., 2004). Seega esineb seos GITR kostimulatoorse aktiivsuse ja vastuvõtlikuse vahel Treg vahendatud supressioonile.

Seega pole GITR Treg rakkude spetsiifiline marker, kuna GITR ekspresseerub nii CD4+CD25<sup>+</sup> kui CD4+CD25<sup>-</sup> T rakkude pinnal ning hoolimata sellest, et Foxp3 kontrollib GITR ekspressiooni, ei ekspresseeri kõik Treg rakud GITR ning GITR ei ole vajalik Treg rakkude supresseerivaks aktiivsuseks.

### ***1.3.3. Kemokiini retseptorid***

Treg rakkude migratsiooni organismis kontrollivad kindlad signaalid, mis tulevad peamiselt kemokiinidelt/kemokiini retseptoritelt ja integriinidelt/integriinide ligandidelt (Wei et al., 2006). Homeostaatilistes tingimustes esinevad Treg rakud peamiselt tüümuses, perifeerses veres, lümfisõlmedes ja põrnas (Shevach 2002).

Immuunrakkude paiknemisel lümfoidsetesse organitesse on olulised integriin CD62L ja kemokiinireseptor CCR7 (Joonis 4). Allogeense transplantaadiga hiirtel, kellele manustati CD62L neutraliseerivat antikeha, vähenes lümfisõlmedes Treg rakkude hulk, mis põhjustas siirdatud organi äratõukamise (Ochando et al., 2005). Kemokiinireseptor CCR7 ligandiks on CCL19, kemokiin, mis ekspresseerub lümfisõlmede T-rakkude rikkas piirkonnas. Treg rakkude aktiveerumisel hakatakse CCR7 asemel ekspresseerima CXCR5, mille ligandiks on CXCL13. Kemokiin CXCL13 ekspresseerub lümfisõlmede B-rakkude rikkas piirkonnas, seega toimub Treg rakkude aktiveerumisel muutus, tavapärane liikumine T-rakkude piirkonna suunas asendub migratsiooniga B-rakkude ala suunas (Lim et al., 2004).



**Joonis 4.** Treg rakkude jaotumine ja liikumine organite ja kudede vahel sõltuvalt kemokiinireseptoritest ja integriinidest, (Wei et al., 2006).

Treg pinnal on näidatud kemokiinireseptorite CCR2 ja CCR5 pidev ekspressioon ning kõrge tundlikkus põletikuliste reaktsioonide eest vastutavate kemokiinide suhtes (Joonis 4), seetõttu saab toimuda Treg kiire migratsioon põletikukoldesse (Iellem et al 2001, Bysty et al 2001). Lisaks kemokiinireseptoritele on Treg rakkude põletikukoldesse liikumisel oluline roll ka integriinidel. Integriin  $\alpha_E$  (CD103)+ Treg rakud, mis

ekspresseerivad vähesel määral CD62L, migreeruvad põletikulistesse piirkondadesse organismis ning osalevad peamiselt perifeersete põletikuprotsesside mahasurumisel (Suffia et al., 2005).

Seega suunatakse CD4+CD25+ Treg rakud juba varajase immuunvastuse käigus põletikulisse keskkonda, seal puutuvad Treg rakud kokku patogeenidega ning interakteeruvad teiste immuunrakkudega.

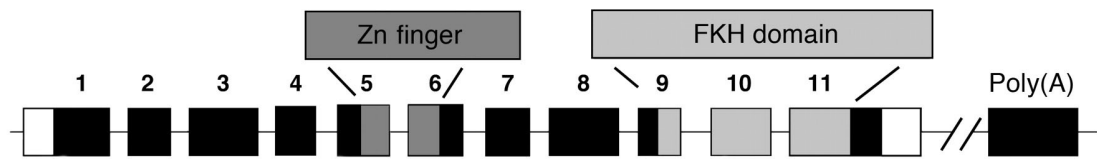
#### ***1.3.4. Transkriptsioonifaktor Foxp3***

Kõige spetsiifilisemaks Treg rakkude markeriks on transkriptsioonifaktor Foxp3 (*forkhead box p3*), mis kuulub *forkhead/winged-helix* transkriptsiooniliste regulaatorite perekonda. Foxp3 mRNA on detekteeritav perifeersetes CD4+CD25+ T rakkudes ja CD25+CD4+CD8- tümotsüütides, samas kui teised T ja B rakud ei ekspresseeri Foxp3 (Hori et al., 2003, Khattri et al., 2003). Vastupidiselt teistele seni leitud CD4+CD25+ Treg rakkude markeritele ei indutseerita Foxp3 ekspressiooni T rakkude aktiveerimisel. Foxp3 ekspressioon on oluline regulaatorsete T rakkude arenemisel ja omab kontrollivat funktsiooni nende rakkude kujunemiseks vajaliku geeniekspressiooni reguleerimisel (Hori et al., 2003).

Nii inimese kui hiire Foxp3 geen koosneb 11 kodeerivast eksonist. Inimese Foxp3 geen paikneb X- kromosoomi väikses õlas (Xp11.23) (Gambineri et al., 2003). Hiire Foxp3 geen paikneb samuti X-kromosoomis (XqA1.1).

Hiire Foxp3 valgu prekursori (*scurfin*) ja inimese Foxp3 valgu prekursori pikkused on vastavalt 429 aa ja 431 aa (Brunkow et al., 2001). Mõlemad valgud on molekulmassiga ~47 kDa (Brunkow et al., 2001). Hiire ja inimese Foxp3 valkude homoloogia on 86 %, kusjuures DNAd siduva *forkhead* domeeni homoloogia on 94 % (Brunkow et al., 2001).

Nii hiire kui inimese Foxp3 valk omab C-terminaalset *forkhead* domeeni, ühte C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> Zn-sõrme ja leutsiiniluku motiivi (Joonis 5).



**Joonis 5.** Foxp3 geeni skemaatiline ülesehitus. Joonisel on näidatud 11 kodeerivat eksonit ning erinevate valgudomeenide asukohad (Bacchetta et al., 2006).

Terve hiire Foxp3 geeni produkt *scurfin* on oluline immuunsüsteemi homeostaasi säilitamisel (Brunkow et al., 2001). Mutatsioonid Foxp3 geenis põhjustavad nii hiires kui inimeses pärilikku X-liitelist autoimmuunhaigust. Sellest tulenevad haigusnähud iseloomustavad, kuivõrd oluline roll on Treg rakkudel immuunsüsteemi normaalsel funktsioneerimisel. Patsientidel, kellel on mutatsioon Foxp3 geenis, esineb väga tõsine ja fataalne autoimmuunhaigus IPEX (*Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked syndrome*) (Gambineri et al., 2003). IPEX sündroomi puhul kujuneb patsiendi esimesel eluaastal välja süsteemne autoimmuunhaigus, mille sagedamini esinevad sümptomid on vesine diarröa, eksematoosne dermatiit, endokrinopaatia (peamiselt esimest tüüpi diabeet) ja tõsised infektsioonid. Lisaks eelnimetatud haigusnähtudele esineb enamikul patsientidest ka Coombsi positiivne aneemia, trombotsütopeenia, neutropeenia ja tubulaarne nefropaatia. Suurem osa IPEX sündroomiga poisslastest sureb esimese eluaasta jooksul. Enamusel IPEX patsientidel esinevatest mutatsioonidest Foxp3 geenis paiknevad *forkhead* piirkonnas, mis viitab selle domeeni olulisusele Foxp3 funktsioneerimisel (Gambineri et al., 2003).

Foxp3 mutantsetel hiirtel (nn *scurfy* hiired) esineb analoogne X-liiteline retsessiivne haigus, kusjuures hemisügootsed isased hiired surevad 16-25 päeva vanuselt. *Scurfy* hiirtel on Foxp3 geenis 2 bp raaminihke insertioon, mille tulemusena sünteesitakse lühem produkt, millel puudub *forkhead* domeen ja tuuma-lokalisatsiooni signaal (NLS) ning seetõttu ei saa see valk toimida kui transkriptsioonifaktor (Brunkow et al., 2001).

Hiirtel, kes ekspresseerivad Foxp3 liiga kõrgel tasemel, on leitud väiksem hulk T rakke ning olemasolevad T rakud prolifereeruvad ja toodavad IL-2 tunduvalt vähem kui normaalsed T rakud, hoolimata sellest, et nende rakkude areng tüümuses on normaalne (Khattari et al., 2003). Foxp3 üleekspresseerivates hiirtes on nii CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> kui CD4<sup>-</sup>

CD8+ rakud supresseerivate omadustega ja CD4+CD25- rakud ekspresseerivad pinnal GITR (Khatti et al., 2003).

Inimese Foxp3 uurimisel on näidatud, et kasvajatega haigetel on suurem hulk Foxp3+ T rakke, mis takistavad keha rakke kasvajakke maha surumast (Beyer & Schultze 2006).

Foxp3 ekspressioon on äärmiselt oluline Treg rakkude arengul ning tegemist on hetkel kõige spetsiifilisema CD4+CD25+ Treg rakkude markeriga. Foxp3 lokaliseerub tuumas ning seetõttu ei saa Foxp3 kasutada CD4+CD25+ Treg rakkude sorteerimisel.

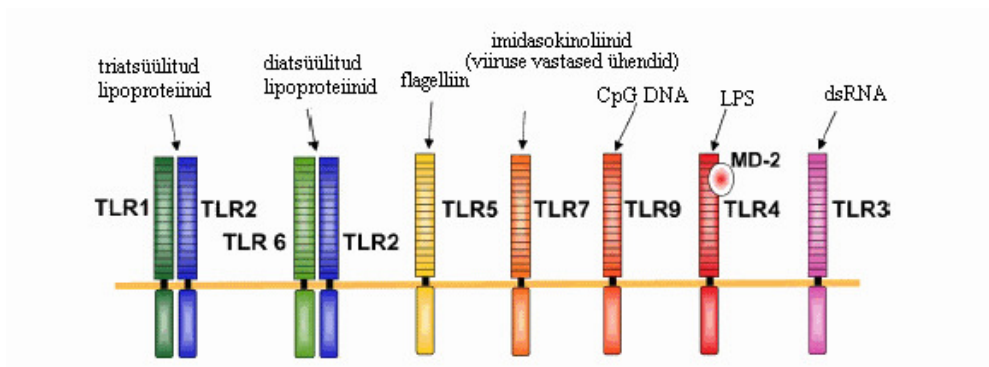
### ***1.3.5 Toll-retseptori sarnased retseptorid***

TLR retseptorid on I tüüpi transmembraansed molekulid, mis tunnevad ära patogeenidega seotud molekulaarseid mustreid (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*). TLR retseptorid on evolutsiooniliselt konserveerunud ning TLR homologid esinevad nii putukates, taimedes kui imetajates. Praegusel hetkel on teada 13 erinevat hiirtel ja inimestel ekspresseeruvat TLR retseptorit.

TLR retseptorid on aktiivsed dimeeridena, enamik neist homodimeerina. TLR2 on võimeline moodustama heterodimeere TLR1 või TLR6-ga, kus iga erinev dimeer omab erinevat ligandispetsiifilisust (Joonis 6). Mõnede TLR retseptorite täielikuks aktiivsuseks võib olla vaja koretseptoreid, näiteks TLR4 puhul on lipopolüsahhariidi (LPS) äratundmiseks vaja MD-2. Erinevad TLR retseptorid seovad erinevaid ligande (Joonis 6), näiteks flagelliini, triatsüülitud ja diatsüülitud lipoproteiine, LPS.

TLR retseptorid ekspresseeruvad kaasasündinud immuunsuses osalevatel rakkudel, peamiselt makrofaagidel, neutrofiilidel ja dendriitrakkudel. Viimastel aastatel on näidatud, et TLR retseptorid ekspresseeruvad ka hiire ja inimese T ja B rakkudel ning tõestatud TLR retseptorite funktsioon nende rakkude pinnal (Brunialti et al., 2002, Castro et al., 1998).





**Joonis 6.** Erinevad TLR retseptorid ja nende ligandid. TLR1-7 tunnevad ära mikroobseid molekule. TLR2 on oluline mikroobsete lipoproteiinide ära tundmisel, TLR1 ja TLR6 moodustavad TLR2 retseptoriga dimeere, mis võimaldab neil retseptoritel eristada vastavalt triatsüülitud- ja diatsüülitud lipoproteiine. TLR9 on CpG DNA retseptor, TLR3 tunneb ära viiruste dsRNA-d (Takeda & Akira 2004).

TLR retseptorite esinemist reguleerivatel T rakkudel on kõige enam uuritud hiire Treg rakkudel (Caramalho et al., 2003, Gelman et al., 2004, Suttmüller et al., 2006a). Inimese Treg rakkude TLR retseptorite ekspressiooni kohta on infot tunduvalt vähem (Tabel 1). Nii inimese kui hiire T rakkude korral on TLR4 retseptori ekspressioon Treg rakkude spetsiifiline: inimese CD4<sup>+</sup> rakud ekspresseerivad TLR4 madalal tasemel ja hiire CD4<sup>+</sup> rakud ei ekspresseeri TLR4 retseptorit. Samas on näidatud TLR4 ekspressioon nii inimese kui hiire Treg rakkudel. Lisaks TLR4 retseptorile on hiire ja inimese Treg rakkudele spetsiifiline TLR5 ja TLR8 ekspressioon.

**Tabel 1.** TLR retseptorite ekspressioon erinevatel T-rakkude populatsioonidel.

Märgistus: ++ tugev ekspressioon; + normaalne ekspressioon; +/- nõrk ekspressioon; - ekspressioon puudub; n/d- pole määratud (Suttmüller et al., 2006b).

	<i>inimese-CD4</i>	<i>inimese-Treg</i>	<i>hiire-CD4</i>	<i>hiire-Treg</i>
TLR1	++	n/d	+	+
TLR2	++	n/d	+	+
TLR3	+	n/d	+/-	-
TLR4	+/-	+	-	+
TLR5	+	++	-	+
TLR6	+/-	n/d	+	+
TLR7	+/-	-	+/-	+
TLR8	+/-	++	-	+
TLR9	+	n/d	+/-	-
TLR10	-	n/d	n/d	n/d

Lisaks TLR retseptorite olemasolule Treg pinnal on näidatud, et Treg rakkude funktsiooni on võimalik TLR sidumisel otseselt mõjutada. Treg rakkude stimuleerimine TLR4 ligandi LPS-ga suurendas Treg rakkude supresseerivat toimet CD4+CD25- T efektorrakkudele (Caramalho et al., 2003). Selline LPS toime Treg rakkudele esines nii koekultuurides, kus hiire Treg rakke stimuleeriti LPS-ga APC rakkude juuresolekul kui ka ilma APC rakkudeta (Caramalho et al., 2003). Inimese Treg rakkude stimuleerimisel TLR5 ligandi flagelliiniga suureneb samuti Treg supresseeriv aktiivsus (Crellin et al., 2005). Lisaks on andmeid selle kohta, et TLR2 defitsiitsetel hiirtel on tunduvalt vähem perifeerseid CD4+CD25+ rakke (Netea et al., 2004). Seega on näidatud LPS otsest mõju hiire Treg rakkude proliferatsioonile ning supresseerivale aktiivsusele (Caramalho et al., 2003), kuid mitmed teised uurimisgrupid pole LPS otsest efekti Treg rakkudele näidata suutnud (Crellin et al., 2005) (Komai-Koma et al., 2004, Suttmüller et al., 2006a).

Lisaks supresseeriva aktiivsuse suurendamisele on LPS võimeline stimuleerima hiire Treg rakkude proliferatsiooni. *In vitro* uuringutes prolifererusid Treg rakud vastusena LPS stimulatsioonile nii APC juuresolekul kui ilma APC rakkudeta (Caramalho et al., 2003). Samas ei mõjutanud ei LPS-i ega flagelliiniga stimuleerimine inimese CD4+CD25+ Treg rakkude proliferatsiooni (Crellin et al., 2005) ning LPS ei suurendanud inimese Treg rakkude supresseerivat aktiivsust (Crellin et al., 2005).

Kuna Foxp3 ekspressioon on iseloomulik CD4+CD25+ Treg rakkudele ning reguleerib nende rakkude arengut ja funktsiooni, on mitmed uurimisgrupid tundnud huvi kuidas TLR retseptorid mõjutavad Foxp3. TLR5 ligandi flagelliiniga aktiveeritud inimese Treg rakkudes on näidatud Foxp3 ekspressiooni tõus (Crellin et al., 2005). Inimese Treg rakkude aktiveerimine LPS-ga või CD3- ja CD28-spetsiifiliste antikehadega vähendas nendes rakkudes Foxp3 ekspressiooni (Lewkowicz et al, 2006, Crellin et al 2005).

#### ***1.3.5.1 TLR4 retseptori ligand lipopolüsahhariid***

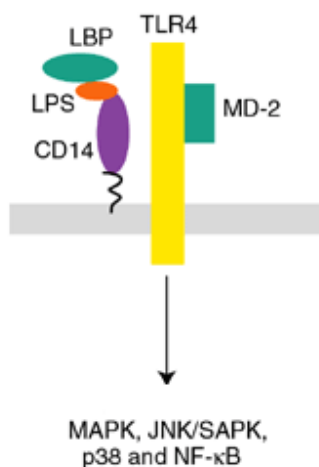
Endotoksiin lipopolüsahhariid on Gram-negatiivsete bakterite välismembraani peamine koostisosa ja põhjustab tugeva immuunvastuse (Caroff & Karibian 2003). LPS

põhjustab B rakkude polükloonaalset aktivatsiooni ning stimuleerib makrofaage ja teisi APC. Lisaks sellele mõjutab LPS otseselt ka T rakke (Castro et al., 1998).

LPS on kompleksne glükolipiid, mille koostisesse kuulub hüdrofiilne polüsahhariidne osa ja hüdrofoobne domeen lipiid A, mis tagab LPS bioloogilise aktiivsuse (Caroff & Karibian 2003). Makrofaagide LPS stimuleerimisel indutseeritakse erinevate tsütokiinide produktsioon, sealhulgas TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, MIP-1 $\alpha/\beta$  (*macrophage inflammatory protein-1 $\alpha/\beta$* ) ning erinevate põletikuliste molekulide süntees (prostanoidid, leukotrieenid, NO) (Akira & Hemmi 2003).

Organismis LPS vabal kujul ei leidu, sest vereringes esinev LPS seondub koheselt LPS siduval valgule (LBP, *LPS binding protein*). LPS-LBP kompleks seondub omakorda glükoproteiinile CD14, mis on rakupinnale seotud glükosüülfosfatidüül inositol (*glycosylphosphatidyl inositol*, GPI) ankru kaudu (Triantafilou & Triantafilou 2004). CD14 eksisteerib lisaks membraan-seotud vormile ka vabalt vereplasmas (Triantafilou & Triantafilou 2004). Kuna CD14 puudub transmembraanne osa, ei saa ta signaali edastada ning LPS/LBP/CD14 kompleks seondub TLR4 retseptorile (Joonis 7) ning aktiveeritakse signaaliülekanerada üle MAP-kinaasi perekonna valkude ja NF- $\kappa$ B (Akira & Hemmi 2003).

LPS kasutatakse palju erinevates eksperimentaalsetes süsteemides nii *in vitro* kui *in vivo* infektsioonide jäljendamiseks. Sagedamini kasutatakse *E. coli* ning *S. typhimurium*'i erinevatest tüvedest puhastatud LPS, kuid kasutusel on ka *S. enterica*, *S. minnesota*, *K. pneumoniae* ja *P. aeruginosa* päritoluga LPS preparaadid.



**Joonis 7.** LPS seondumine tema retseptoritele. (Triantafilou & Triantafilou 2004).

## 2. Töö eesmärgid

Vastavalt eelpooltoodule, olid antud töö eesmärgid järgmised:

1. Uurida LPS (*Salmonella typhimurium*) toimet hiire põrnast eraldatud lümfotsüütidele
2. Sorteerida võimalikult kõrge puhtusastmega CD4+CD25+ rakud (Treg) ja CD4+CD25- hiire põrnarakkudest ning selgitada, kas LPS mõjutab otseselt Treg rakke
3. uurida, kas LPS mõju hiire põrnarakkudest eraldatud CD4+CD25+ rakkudele sõltub IL-2 juuresolekust ning CD4+CD25+ rakkude aktivatsioonist
4. uurida LPS mõju hiire põrnarakkudest eraldatud CD4+CD25+ rakkudes Foxp3 ekspressioonile ning selle sõltuvust IL-2 juuresolekust ja CD4+CD25+ rakkude aktivatsioonist
5. Uurida, kas TGF- $\beta$  toimel on võimalik genereerida CD4+CD25- rakkudest kui arvatavatest CD4+CD25+ eellasrakkudest Treg rakke

### 3. Eksperimentaalne osa

#### 3.1. Materjalid ja meetodid

##### 3.1.1. Reagendid

Antud töös kasutati LPS, mille algmaterjaliks oli *Salmonella typhimurium* (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA). Rekombinantne IL-2, inimese rekombinantne latentne transformeeriv kasvufaktor  $\beta 1$  (rTGF- $\beta 1$ , albumiinivaba) saadi firmalt R&D Systems (Abington, UK).

BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus Kit, hiire CD16-/CD32-spetsiifiliste antikehade lahus, hiire CD69-spetsiifilise antikeha PE konjugaat, hiire CD3-spetsiifiline antikeha ning hiire CD28-vastane antikeha osteti firmalt Becton Dickinson Biosciences (San Diego, USA). Hiire CD4-spetsiifilise antikeha FITC konjugaat ja hiire CD25-spetsiifilise antikeha PE konjugaat saadi firmalt Miltenyi Biotec GmbH (Bergish Gladbach, Saksamaa).

Ficoll-Paque saadi firmalt Amersham Biosciences AB (Buckinghamshire, UK). 3-(4,5-dimetüül-2-tiasolüül)-2,5-difenüül-2H tetrasoolium bromiid (MTT) osteti firmalt SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Saksamaa).

Hiire Foxp3-spetsiifilise antikeha APC konjugaat osteti firmalt eBioscience (San Diego, USA). 7-AAD saadi firmalt Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA).

Rakkude kasvatamisel kasutati kõikides eksperimentides RPMI 1640 söödet, millele lisati veise loote seerumit (10%), penitsilliini (100 U/ml), streptomütsiini 0.1 mg/ml ja  $2 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -merkaptotetanooli.

Puhverlahusena kasutati fosfaatpuhverdatud soolalahust (PBS, 0.15 M NaCl, 2.7 mM KCl, 0.01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_3$ , pH 7.4). Rakkude töötlemisel kasutati PBS puhverlahust, mis sisaldas 0.5 % BSA ja 2 mM EDTA.

### **3.1.2. Hiire põrnarakkudest lümfotsüütide eraldamine**

Eksperimentides kasutati hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüüte või põrnarakkude sorteerimisel eraldatud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakupopulatsioone.

Hiired (129S<sub>v</sub>/S<sub>6</sub>, TÜ MRI vivaarium) hukati kasutades tservikaalset dislokatsiooni, seejärel eemaldati hiirtelt põrnad. Hiire põrnast valmistati rakususpensioon ning lümfotsüütide eraldamiseks teostati gradient-tsentrifuugimine Ficoll-Paque lahusega (tihedus 1.077 g/l; 7 ml põrnarakususpensiooni PBS lahuses kihitati 5 ml Ficoll-Paque lahusele), tsentrifuugiti 400xg 20 min 22 °C juures. Eraldatud lümfotsüüdid pesti PBS lahusega (0.5 % BSA, 2 mM EDTA), tsentrifuugiti (300xg 10 min 4 °C juures) ning suspendeeriti RPMI 1640 söötmes.

Lümfotsüüdid ning sorteeritud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakud eraldati hiire põrnarakkudest iga uuringu jaoks eraldi ning kasutati koheselt peale eraldamist. Kuna igas katses kasutati erinevatelt hiirelt pärit põrnarakke, siis võivad lümfotsüütide individuaalsed erinevused mõjutada mõnevõrra LPS ning tsütokiinide toimet neile rakkudele. Seetõttu viidi kõik katsed läbi vähemalt kahes sõltmatus paralleelis ning katseid korrati kuni 4 korda.

### **3.1.3. CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude eraldamine**

CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakupopulatsioonid saadi hiire põrnarakkude suspensiooni sorteerimisel FACSAria rakusorteril (*Becton Dickinson, USA*). Enne sorteerimist märgistati rakud CD4-FITC ja CD25-PE antikehadega. CD4+CD25+ rakupopulatsiooni puhtusaste oli suurem kui 94 %, CD4+CD25- rakkude korral oli puhtusaste 99 %.

#### **3.1.4. Rakkude proliferatsiooni määramine MTT meetodil**

Rakud kasvatati 96-kannulisel mikroplaadil erinevate stiimulite juuresolekul ning elusrakkude hulga määramiseks lisati MTT reaktiiv (lõppkontsentratsioonis 0.5 µg/ml), inkubeeriti 4 h (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) ning tekkinud lahustumatute formasaani-kristallide lahustamiseks lisati solubiliseerivat lahust (10 % SDS, 0.01 N HCl). Kristallide solubiliseerimiseks inkubeeriti mikroplaati 24 h (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) ja seejärel määrati neeldumine 540 nm juures (*Genious Reader, Tecan Group Ltd Maennedorf, Šveits*), kasutades programmi *Magellan Software (Tecan Group Ltd Maennedorf, Šveits)*.

#### **3.1.5. Rakkude märgistamine läbivoolu tsütomeetril analüüsimiseks**

Rakud kasvatati 24-kannulisel (lümfootsüüdid) või 96-kannulisel (eraldatud CD4+CD25+ või CD4+CD25- rakud) koekultuuri plaadil. Pärast inkubeerimist soovitud aja jooksul rakud koguti ja tsentrifuugiti 212xg 5 min 20 °C juures. Rakud suspendeeriti PBS puhverlahuses, mis sisaldas 0.5 % BSA ja 2 mM EDTA. Esmalt blokeeriti rakkude Fc-retseptorid hiire CD16- ja CD32-vastaste antikehade lahusega (lõppkontsentratsioonis 1 µg/ml) 5 min jään. Seejärel märgistati rakud CD4-FITC ja CD25-PE või CD69-PE antikehadega, inkubeeriti 10 min jään ning pesti puhverlahusega. Märgistatud rakud resuspendeeriti puhverlahuses. Surnud rakkude märgistamiseks lisati 7-AAD ning analüüsiti läbivoolu tsütomeetril (*FACSCalibur, Becton Dickinson, USA*) lugedes 30 000 rakku, kasutades programmi *CellQuest (Becton Dickinson, USA)*.

Foxp3 määramiseks märgistati rakud eelnevalt CD4 ja CD25 pinnamarkerite suhtes ülalkirjeldatud meetodil ning pesti. Rakkude fikseerimine teostati vastavalt BD Cytofix/Cytoperm™ Plus eeskirjale. Esmalt suspendeeriti rakud CytoPerm/CytoFix lahuses, inkubeeriti 20 min 4 °C juures ning rakud pesti CytoWash pesulahusega. Rakkude Fc-retseptorid blokeeriti hiire CD16/CD32 antikehi sisaldava lahusega CytoWash pesulahuses (1 µg/ml), inkubeeriti 10 min 4 °C juures. Seejärel lisati hiire Foxp3 antikeha

APC konjugaat ja inkubeeriti 30 min 4 °C juures. Rakud pesti CytoWash pesulahusega, resuspendeeriti PBS-BSA-EDTA puhvril ning analüüsiti läbivoolu-tsütomeetril.

Kõikides eksperimentides kasutatud fluorokroomiga konjugeeritud antikehade optimaalsed kontsentratsioonid olid määratud eelnevates katsetes.

### ***3.1.6. LPS mõju hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütidele***

Lümfotsüütid ( $2 \times 10^6$  rakku/ml) külvati 24-kannulisele plaadile (1 ml/kannus) RPMI 1640 söötmes. Rakkude stimuleerimiseks lisati LPS (lõppkontsentratsioonis 10 µg/ml) või PBS samas hulgas stimuleerimata rakkudele (kontroll). Rakke kasvatati 3, 6, 9, 24 ja 30 h 37 °C juures 5 % CO<sub>2</sub> manulusel. Seejärel rakud koguti, märgistati kasutades CD4-FITC, CD25-PE ja CD69-PE antikehi ning analüüsiti läbivoolu tsütomeetril.

Lisaks uuriti LPS toime sõltuvust tema kontsentratsioonist. Lümfotsüüdid ( $3 \times 10^6$  rakku/ml) külvati 24-kannulisele plaadile (1 ml/kannus), lisati rakkude stimuleerimiseks erinevas kontsentratsioonis LPS (15...2 µg/ml). Kontrollina kasvatati stimuleerimata rakke. Rakke inkubeeriti 24 h 37 °C juures 5 % CO<sub>2</sub> manulusel. Seejärel rakud koguti, märgistati kasutades CD4-FITC, CD25-PE ja CD69-PE antikehi ning analüüsiti läbivoolu tsütomeetril.

### ***3.1.7. LPS mõju hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütide proliferatsioonile***

Lümfotsüütid ( $10^6$  rakku/ml) külvati 96-kannulisele mikroplaadile (100 µl/kannus), lisati erinevas kontsentratsioonis LPS (15...2 µg/ml) või kasvatati rakke stiimulita (PBS, kontroll). Rakke inkubeeriti 72 h 37 °C juures 5 % CO<sub>2</sub> manulusel ning määrati seejärel rakkude proliferatsioon MTT meetodil.



### ***3.1.8. Foxp3 ekspressiooni määramine CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudes***

Rakkude aktiveerimiseks inkubeeriti mikroplaadi kannud esmalt CD3 antikeha lahusega PBS puhvris 2-4 h 37 °C juures (1 µg/ml, 50 µl) vahetult enne rakkude külvamist. Söötmel lisati hiire CD28-vastast antikeha lahust (1 µg/ml). Eraldatud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakud ( $3.6 \times 10^5$  rakku/ml) külvati mikroplaadile. Võrdlusena kasvatati rakke ilma neid antikehi lisamata. Nii CD3/CD28 antikehadega aktiveeritud kui stimuleerimata rakkudele lisati LPS (5 µg/ml), IL-2 (10 ng/ml) või TGF-β1 (5 ng/ml). Kontrollina kasvatati rakke ilma ühtegi stiimulit lisamata. Rakke kasvatati 72 h 37 °C juures 5 % CO<sub>2</sub> manulusel, seejärel rakud koguti, märgistati kasutades CD4-FITC, CD25-PE ja Foxp3-APC antikehi ning analüüsiti läbivoolu tsütomeetril.

CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude elulemuse uurimiseks stimuleeriti rakke ülalkirjeldatud viisil. Rakke kasvatati 3 päeva ja 7 päeva 37 °C juures 5 % CO<sub>2</sub> manulusel. Rakke, mida kasvatati 7 päeva stimuleeriti CD3/CD28 antikehadega ja kasvatati IL-2 juuresolekul, kontrollina kasvatati rakke, millele ei lisatud stiimuleid. Rakkude elulemus määrati läbivoolu tsütomeetril kasutades rakkude töötlemist 7-AAD lahusega.

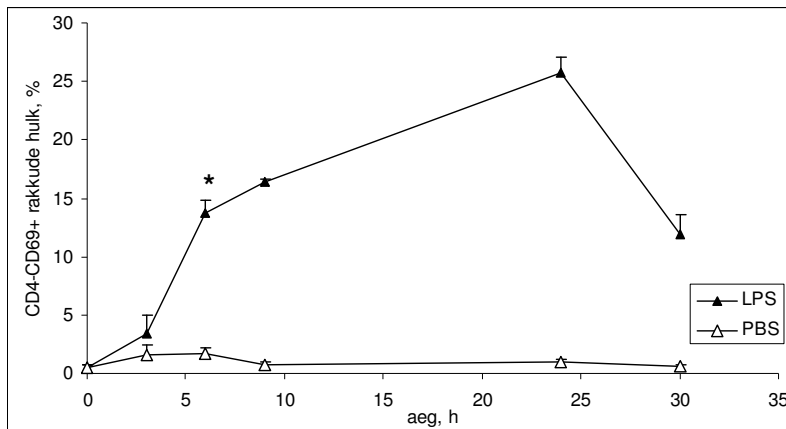
### ***3.1.9. Statistiline analüüs***

Saadud tulemused on esitatud kahe kuni kolme eksperimendi tulemuste keskmiste väärtustena, näidates üksiktulemuse erinevuse keskmisest standardveana. Igas eksperimendis olid proovid dubleeritud. Tulemuste analüüsimisel kasutati programme Microsoft Office Excel ja R (*R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*). Statistiliselt oluliseks erinevuseks loeti  $p < 0.05$ .

## 3.2. Tulemused

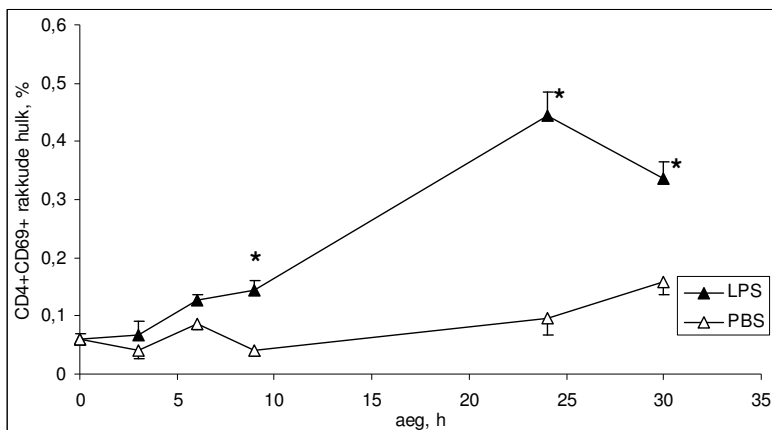
### 3.2.1. LPS toime põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütidele

Kuna mitmed töögrupid on näidanud TLR retseptorite ekspressiooni T ja B rakkudel ning Treg rakkudel (Caramalho et al., 2003, Suttmüller et al., 2006a), siis uuriti LPS (10 µg/ml) mõju hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütidele. Kontrollina lisati rakkudele PBS. LPS mõju hindamisel määrati pinnamarker CD69 ekspressioon läbivoolu tsütomeetril. LPS toime CD69 ekspressioon suurenes märgatavalt CD4<sup>+</sup> rakkudel 6 h möödumisel LPS stimuleerimisest ( $p < 0.001$ ) (Joonis 8). Suurenenud CD69 ekspressioon CD4<sup>+</sup> rakkudel oli detekteeritav kuni 24 h ning seejärel vähenes. Stimuleerimata rakkudel ei detekteeritud olulist CD69 taseme suurenemist.



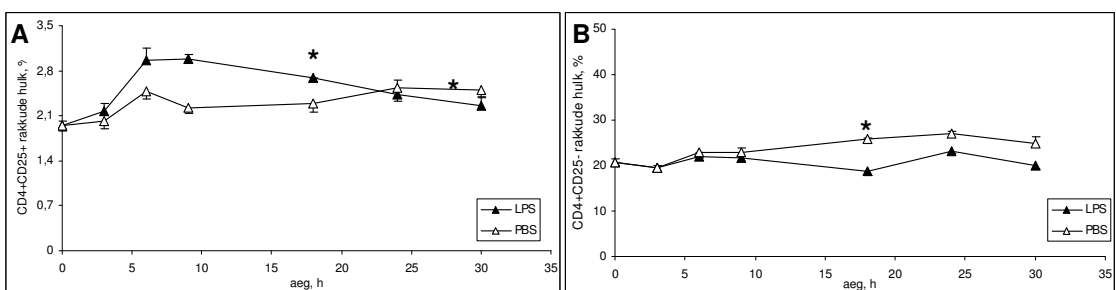
**Joonis 8.** LPS mõju hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütides CD4-CD69+ rakkudele. \* $p < 0.05$

Sarnane efekt kui CD4<sup>+</sup> rakkudel detekteeriti samuti CD4<sup>+</sup> lümfotsüütide korral (Joonis 9), kus CD69 ekspressiooni tõus oli märgatav 9 h möödumisel LPS stimulatsioonist ( $p < 0.01$ ) ning saavutas kõrgeima taseme 24 h järel. CD69 ekspressioon LPS stimuleeritud rakkudel oli märgatavalt kõrgem kui kontrollrakkudel.



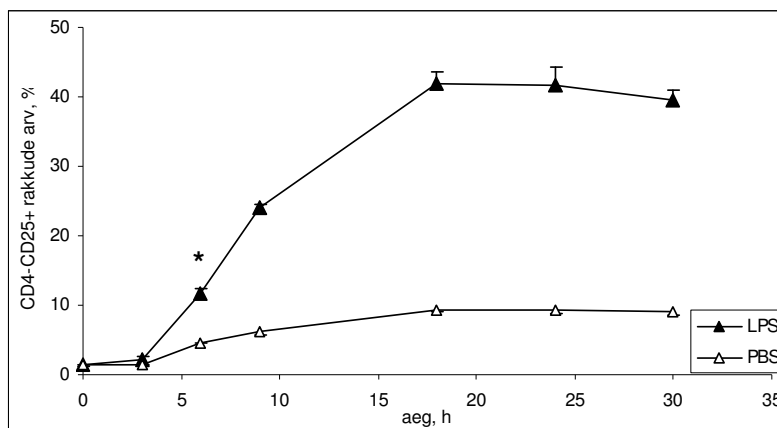
**Joonis 9.** LPS mõju hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütide CD4+ rakkude aktivatsioonile. \* $p < 0.05$

Lisaks CD69 ekspressioonile, mis on rakkude varajase aktivatsiooni markeriks, määrati lümfotsüütidel CD25 retseptori ekspressioon LPS toimel (Joonis 10A, 11). LPS-stimuleeritud lümfotsüütide populatsioonis oli CD4+CD25+ rakkude hulk suurem võrreldes stimuleerimata rakkudega 9-18 h möödumisel LPS stimulatsioonist ( $p < 0.01$ ) (Joonis 10A).



**Joonis 10.** LPS mõju hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütides CD4+CD25+ (A) ja CD4+CD25- (B) rakkudele. \* $p < 0.05$

CD4+CD25- rakkude arv vähenes LPS stimuleeritud lümfotsüütide hulgas võrreldes stimuleerimata lümfotsüütidega 18 h inkubeerimise järel ( $p < 0.01$ ) (Joonis 10B). CD4-rakkudel suurenes CD25 ekspressioon oluliselt juba 6 h inkubeerimise järel ( $p < 0.001$ ) võrreldes PBS juuresolekul kasvatatud rakkudega (Joonis 11).



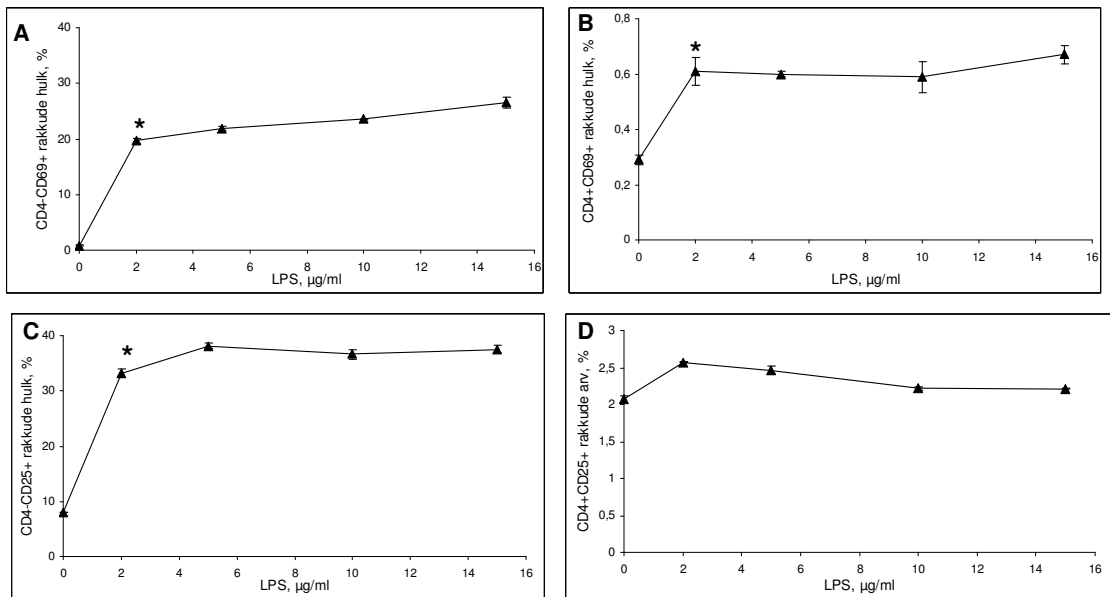
**Joonis 11.** LPS aktiveerib hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütides CD4- rakkudel CD25 retseptori ekspressiooni. \* $p < 0.05$

### 3.2.2. LPS erinevate kontsentratsioonide toime põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütidele

Järgnevalt uuriti, kas LPS toime lümfotsüütidele sõltub LPS kontsentratsioonist. Hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüüte stimuleeriti erinevas kontsentratsioonis LPS kasutades (2...15 µg/ml), rakke kasvatati 24 h ning LPS mõju hindamiseks määrati CD69 ja CD25 ekspressioon CD4+ ja CD4- rakkudel. CD4- rakkude CD69 ekspressioonitase suurenes LPS kontsentratsiooni suurenemisel (Joonis 12A). Võrreldes stimuleerimata rakkudega, ekspresseerisid 2 µg/ml LPS stimuleeritud rakud CD69 kõrgel tasemel ( $p=0.03$ ).

CD4+ lümfotsüütide korral oli LPS kontsentratsioon 2 µg/ml, mille puhul LPS-stimuleeritud rakud ekspresseerisid CD69 kõrgemal tasemel võrreldes stimuleerimata rakkudega ( $p=0.04$ ) (Joonis 12B). Edasine LPS kontsentratsiooni suurendamine mõju ei omanud.

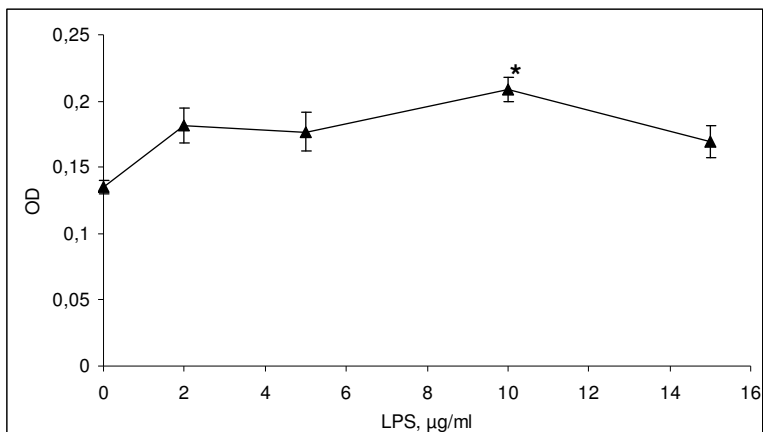
LPS väikestel kontsentratsioonidel (2 µg/ml) suurenes CD25 ekspressioon nii CD4- kui CD4+ rakkudel võrreldes stimuleerimata rakkudega. LPS kontsentratsiooni suurenemisel CD25 ekspresseerivate lümfotsüütide arv ei muutunud (Joonis 12C ja D).



**Joonis 12.** Erinevate LPS kontsentratsioonide mõju hiire lümfotsüütidele. CD69 ekspressioon CD4- rakkudel (A) ja CD4+ rakkudel (B). CD25 ekspressioon CD4- rakkudel (C) ja CD4+ rakkudel (D).  
\* $p < 0.05$

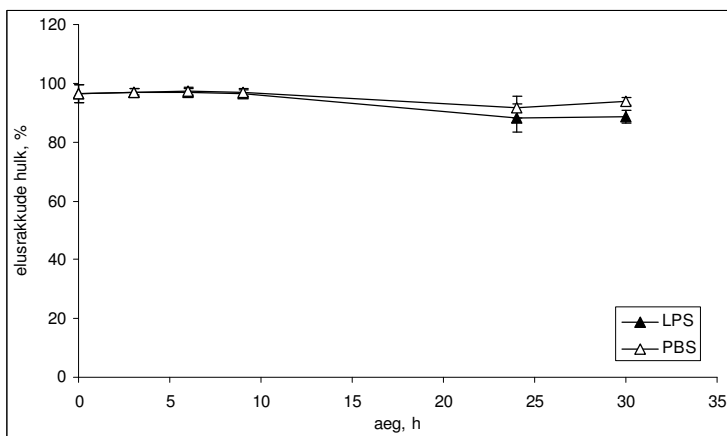
### 3.2.3. LPS toime hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütide proliferatsioonile

Lümfotsüütide proliferatsiooni hindamiseks lisati erinevas kontsentratsioonis LPS (2...15 µg/ml), rakke kasvatati 72 h ning detekteeriti elusrakkude hulk MTT meetodil. Kontrollina lisati rakkudele PBS. LPS põhjustas rakkude proliferatsiooni suurenemist sõltuvalt lisatud LPS kontsentratsioonist (Joonis 13) ning oli märgatavalt suurem kui kontrollrakkude proliferatsioon ( $p < 0.01$ ).



**Joonis 13.** Hiire põrnast eraldatud lümfotsüütide proliferatsioon erinevate LPS kontsentratsioonide korral. \* $p < 0.05$

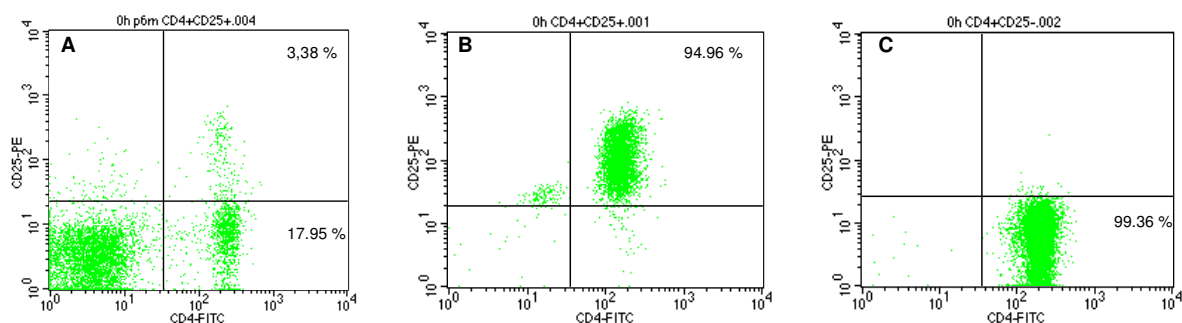
Elusrakkude hulga määramiseks läbivoolu tsütomeetril lisati rakkudele 7-AAD reagenti. Lümfotsüütide arv ei muutunud oluliselt 30 h jooksul peale LPS stimuleerimist ning elusrakkude hulk oli võrreldav stimuleerimata rakkudega (Joonis 14).



**Joonis 14.** Lümfotsüütide elulemus LPS (10 µg/ml) toimet.

### 3.2.4. Hiire põrnarakkude sorteerimisel saadud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakupopulatsioonid

CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakupopulatsioonid saadi hiire põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütide sorteerimisel läbivoolu tsütomeetril FACS Aria. Põrnarakkudes detekteeriti CD4+CD25+ rakke keskmiselt 2 % ja CD4+CD25- rakke keskmiselt 20 %, kuid rakkude sorteerimise tulemusel saadi CD4+CD25+ rakud > 94 % ning CD4+CD25- rakud > 99 % puhtusega (Joonis 15).

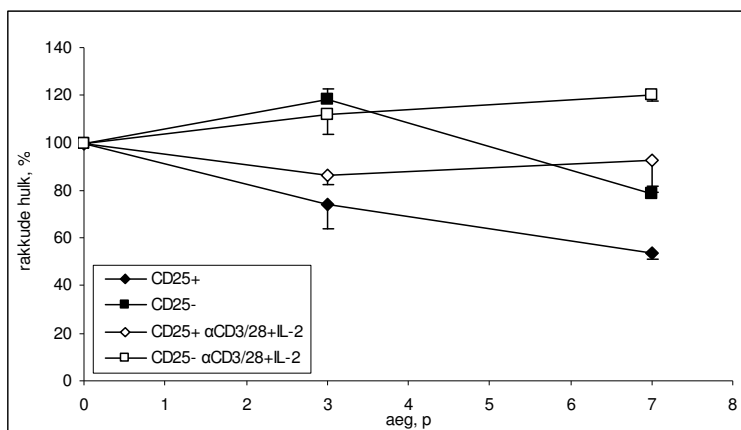


**Joonis 15.** Rakkude sorteerimisel läbivoolu tsütomeetril FACS Aria saadud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude populatsioonid. A. CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude hulk lähtematerjalis. B. Sorteeritud CD4+CD25+ rakud. C. Sorteeritud CD4+CD25- rakud.

### 3.2.5. CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakupopulatsioonide elulemus

Esmalt uuriti sorteerimisel saadud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude elulemust. Selleks kasvatati rakke 7 päeva ilma stiimulita või CD3- ja CD28-spetsiifiliste antikehade ja IL-2 juuresolekul, mis on vajalikud CD4+CD25+ rakkude aktivatsiooniks ja elulemuseks *in vitro* (Thornton et al., 2004). Elusrakkude arv määrati alghetkel, seejärel 3 päeva ja 7 päeva möödumisel rakkude stimuleerimisest. Stimuleerimata rakkude korral vähenes nii CD4+CD25+ kui CD4+CD25- rakkude arv (vastavalt 53 % ja 78 %) võrreldes algselt külvatud rakkude hulgaga (Joonis 16). Aktiveeritud rakkude korral oli elusrakkude arv mõlemas rakupopulatsioonis suurem kui stimuleerimata rakkude korral, 7 päeva möödudes

aktivatsiooni algusest oli CD4+CD25+ rakke 92 % algsest rakkude hulgast ning CD4+CD25- rakke 119 % võrreldes alghetkel külvatud rakkude arvuga.



**Joonis 16.** Sorteeritud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude elulemus 7 päeva jooksul aktiveerimata (CD25+ ja CD25-) või aktiveeritud ( $\alpha$ -CD3/28 + IL-2) rakkude hulgas.

### 3.2.6. TCR stimuleerimise ja CD28 kostimulatsiooni mõju CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudele

CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude stimuleerimiseks kasvatati rakke plaadile kinnitatud CD3-antikeha ja söötmesse lisatud CD28-spetsiifilise antikeha juuresolekul. Söötmele lisati ka rIL-2, mis on oluline CD4+CD25+ rakkude homeostaasil (Antov et al., 2003). IL-2 juuresolekul suurenes märgatavalt aktiveerimata CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude elulemus võrreldes stimuleerimata rakkudega (Joonis 17B), kuid rakkude aktiveerimine CD3/CD28-antikehadega lisaks IL-2 stimulatsioonile enamat mõju ei avaldanud. CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude elulemus oli suurem CD3/CD28 stimuleerimisel võrreldes stimuleerimata rakkudega.

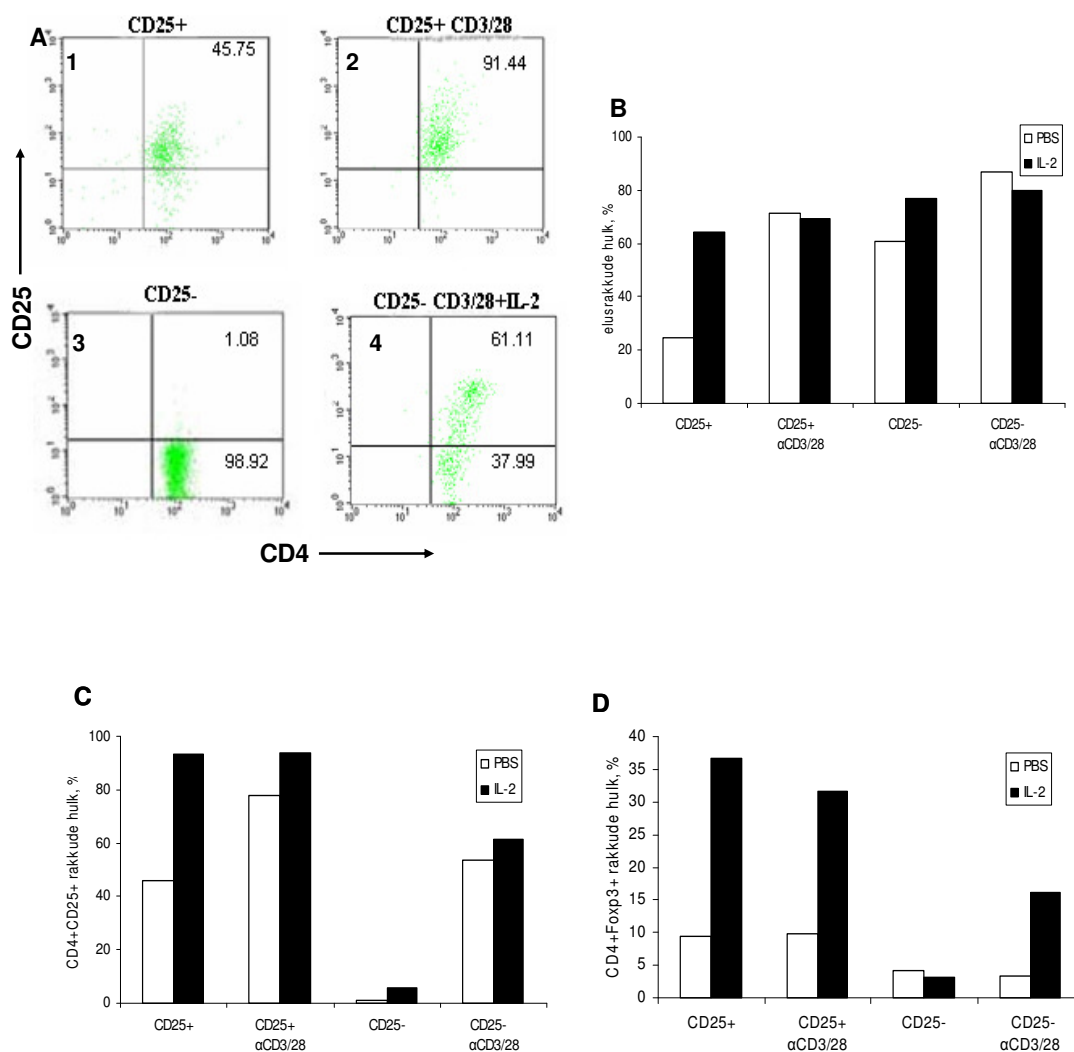
Rakkude aktiveerumise hindamiseks määrati CD25 ekspressioon raku pinnal. Sorteeritud CD4+CD25+ rakkude stimuleerimisel CD3/CD28-antikehadega suurenes CD25 ekspressioon (Joonis 17C) võrreldes stimuleerimata populatsiooniga, kusjuures IL-2 lisamine CD3/CD28-stimuleeritud rakkudele suurendas veelgi enam CD25 ekspressiooni. Aktiveerimata CD4+CD25- rakupopulatsioonis detekteeriti CD25+ rakke minimaalselt,



kuid CD4+CD25- rakkude aktiveerimisel CD3/CD28-antikehadega hakkasid CD4+CD25- rakud ekspresseerima CD25 retseptorit ning CD25 ekspressioonitase suurenes oluliselt (Joonis 17A ja C).

Kuna CD25 on nii rakkude aktivatsiooni markeriks kui ka Treg rakkude üheks spetsiifiliseks tunnuseks, siis eristamaks, kas on tegemist Treg rakkudega või aktiveeritud T rakkudega määrati Treg rakkude spetsiifilise transkriptsioonifaktor Foxp3 ekspressioon nendes rakkudes. IL-2 juuresolek soodustas Foxp3+CD4+ rakkude arvu suurenemist CD4+CD25+ rakkudes (Joonis 17D). CD4+CD25+ rakkude CD3/CD28 stimulatsioon ei põhjustanud CD4+Foxp3+ rakkude hulgas muutusi kui IL-2 puudus. IL-2 juuresolekul ning CD3/CD28-stimuleeritud CD4+CD25+ rakkudes oli Foxp3 ekspressioon kõrgem kui IL-2 puudumisel.

Vaatamata sellele, et detekteeriti suhteliselt suur arv CD4+CD25+ rakke CD4+CD25- rakkude populatsioonis, ei ekspresseerinud suurem osa neist rakkudest Foxp3 (Joonis 17D). IL-2 lisamine CD4+CD25- rakkudele Foxp3 ekspressiooni ei soodustanud. CD4+CD25- rakkude aktiveerimisel (CD3/CD28-stimulatsioon) ning IL-2 juuresolekul Foxp3 ekspressioon suurenes.



**Joonis 17.** CD3/CD28-antikehade ning IL-2 toime CD4+CD25+ (joonisel CD25+) ja CD4+CD25- (CD25-) rakkudele. Rakke kasvatati 3 päeva ning analüüsiti läbivoolu tsütomeetril. **A.** CD4+CD25+ rakud 3 päeva möödumisel stimulatsioonist: stimuleerimata rakud (1) ning CD3/CD28-stimuleeritud rakud (2); stimuleerimata CD4+CD25- rakud (3) ja CD4+CD25- rakud CD3/CD28 ja IL-2 juuresolekul (4). **B.** CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude elulemus. **C.** CD25 ekspressioon CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudel. **D.** Foxp3 ekspressioon CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudes.

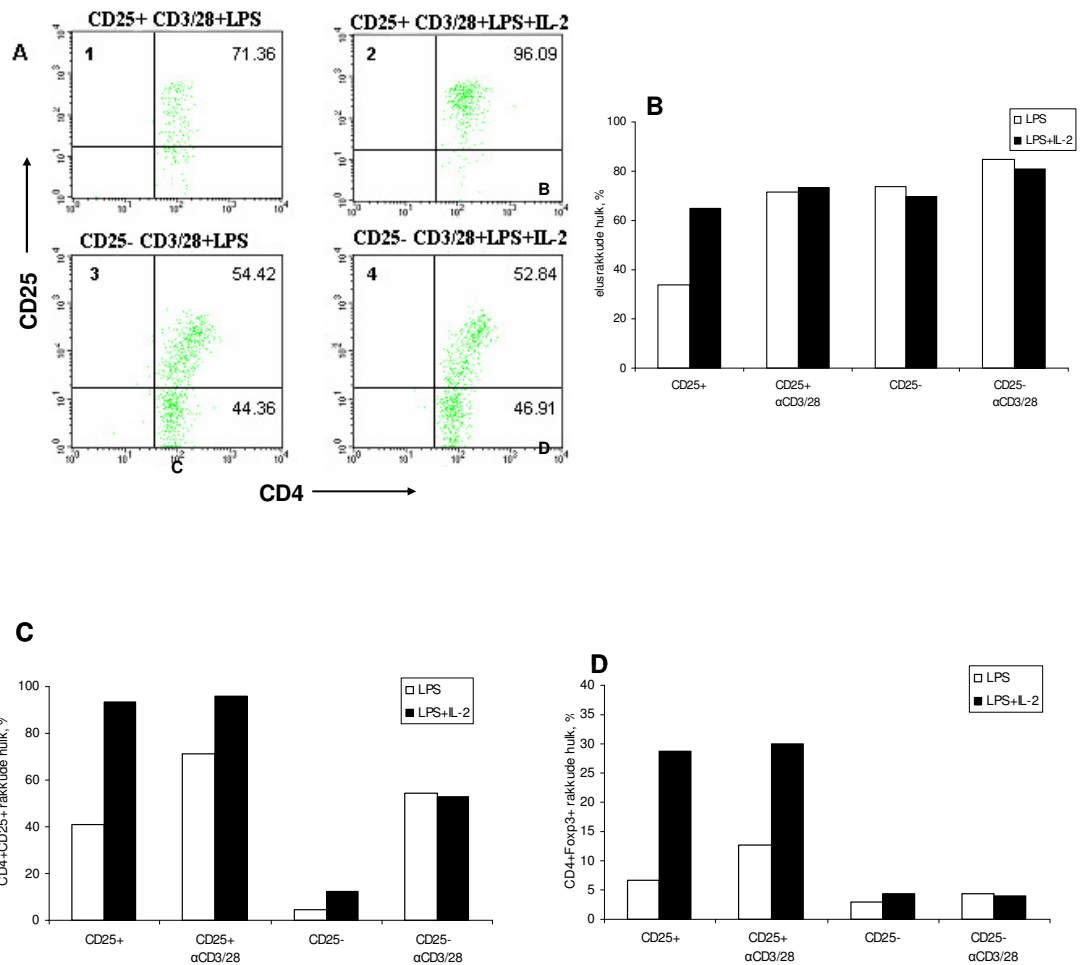
### 3.2.7. LPS mõju CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudele

Kuna eelnevates eksperimentides näidati IL-2 vajalikkus CD4+CD25+ rakkude elulemusele *in vitro* sarnaselt varem kirjeldatule (Thornton et al., 2004), siis uuriti, kas LPS toimet võib mõjutada IL-2 juuresolek või mitte. Selleks stimuleeriti CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakke LPS ja IL-2 juuresolekul või ilma. Samuti uuriti kas LPS toime sõltub sellest, et rakke oli eelnevalt aktiveeritud. IL-2 kasutamine lisaks LPS stimulatsioonile suurendas elusrakkude hulka aktiveerimata CD4+CD25+ rakkude korral, kus IL-2 ja LPS koosmõjul oli elusrakkude arv oluliselt suurem kui LPS stimuleeritud rakkudel (Joonis 18B). Samuti suurendas LPS stimuleeritud CD4+CD25+ rakkude aktiveerimine oluliselt nende elulemust võrreldes aktiveerimata rakkudega. Nii LPS kui LPS ja IL-2 juuresolekul kasvatatud rakkude elulemus oli võrreldav aktiveeritud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudel ning aktiveerimata CD4+CD25- rakkudel. LPS soodustas CD4+CD25- rakkude elulemust, kuid IL-2 juuresolek mõnevõrra vähendas nii aktiveeritud kui aktiveerimata rakkude elulemust.

Seejärel uuriti CD25-retseptori ekspressiooni aktiveeritud ja aktiveerimata rakkudel ning LPS ja IL-2 koosmõjul. LPS-stimuleeritud CD4+CD25+ rakkude korral ekspresseerisid CD3/CD28 aktiveeritud rakud CD25 enam kui stimuleerimata rakud (Joonis 18C). LPS ja IL-2 juuresolekul kasvatatud CD4+CD25+ rakkude CD25 ekspressioon oli tunduvalt suurem võrreldes LPS stimuleeritud rakkudega ning ei sõltunud sellest, kas rakke oli eelnevalt aktiveeritud CD3/CD28 antikehadega või mitte (Joonis 18C).

CD4+CD25- rakkudel suurenes CD25 ekspressioon LPS ja IL-2 koosmõjul aktiveerimata rakkudel. Aktiveeritud CD4+CD25- rakkudel LPS ja IL-2 juuresolek CD25 ekspressiooni ei suurendanud võrreldes aktivatsiooniga (Joonis 17C).

Järgmisena uuriti Foxp3 ekspressioonitaset LPS ja IL-2 juuresolekul kasvatatud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudes (Joonis 18D). Aktiveerimata CD4+CD25+ rakkudes põhjustas LPS lisamine Foxp3 ekspressioonitaseme languse (~10 % CD4+Foxp3+ rakke PBS juuresolekul). IL-2 juuresolek, sõltumata CD4+CD25+ rakkude aktiveerimisest või mitte, soodustas Foxp3+ rakkude arvu suurenemist LPS-ga stimuleerimisel. CD4+CD25- rakud LPS ja LPS + IL-2 koosmõjul ei ekspresseerinud Foxp3 märgataval tasemel.



**Joonis 18.** LPS ja IL-2 toime sorteeritud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudele. **A.** CD4+CD25+ rakud 3 päeva möödumisel CD3/CD28 ja LPS stimulatsioonist ilma IL-2 (1); ja IL-2 juuresolekul (2); CD4+CD25- rakud CD3/CD28 ja LPS lisamisel ilma IL-2 (3); ja IL-2 juuresolekul (4). **B.** CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude elulemus LPS ja IL-2 toimel. **C.** CD25 retseptori ekspressioon CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudel. **D.** Foxp3 ekspressioon CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudes.

### 3.2.8. TGF- $\beta$ mõju CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudele

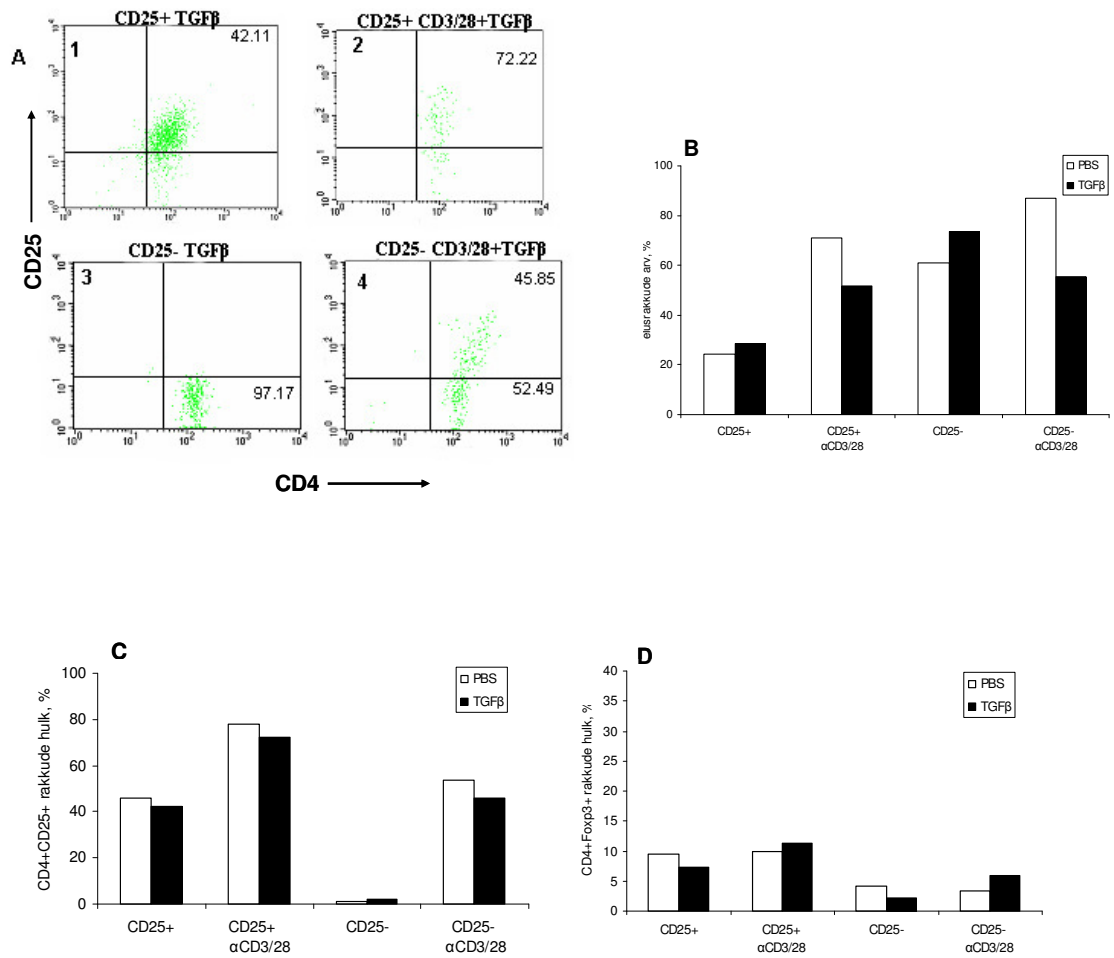
Treg rakkude poolt sünteesitav TGF- $\beta$  on oluline tsütokiin Treg rakkude supresseeriva aktiivsuse tagamisel *in vivo* (Huber et al., 2004) ning mitmed töögrupid on näidanud, et *in vitro* tingimustes soodustab TGF- $\beta$  juuresolek CD4+CD25- rakkudest CD4+CD25+ rakkude ning Foxp3 ekspresseerivate rakkude teket (Fantini et al., 2004).

TGF- $\beta$  mõju uurimiseks sorteeritud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudele stimuleeriti neid rakupopulatsioone eelnevalt happega aktiveeritud TGF- $\beta$  lahusega, lisaks kasutati rakkude aktiveerimiseks CD3/CD28-antikehi. Antud töös kasutati rekombinantset latentset TGF- $\beta$ , mis vajas eelnevalt aktiveerimist. Aktiveerimiseks kasutati enamlevinud meetodit happega töötlemist.

TGF- $\beta$  lisamine vähendas aktiveeritud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude elulemust. Ainult aktiveerimata CD4+CD25- rakkude korral detekteeriti elusrakkude hulga suurenemine (Joonis 19B).

Elusrakkude hulgas CD25 ekspressiooni määramisel ilmnes, et TGF- $\beta$  lisamine ei mõjutanud oluliselt CD25 ekspressiooni CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudel (Joonis 19C). CD4+CD25- aktiveeritud rakkudel CD25 ekspressioonitase vähenes mõnevõrra.

Foxp3 ekspressioonitase ei muutunud oluliselt TGF- $\beta$  stimuleerimisel ega rakkude eelneval aktiveerimisel (Joonis 19D). Aktiveerimata CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude korral vähenes TGF- $\beta$  juuresolekul mõnevõrra Foxp3 ekspressioon ning rakkude aktiveerimisel oli märgata Foxp3 ekspressiooni suurenemist TGF- $\beta$  lisamisel, kuid need muutused ekspressioonitasemes ei olnud olulised ( $p > 0.05$ ).



**Joonis 19.** TGF- $\beta$  mõju eraldatud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudele. **A.** CD4+CD25+ rakud 3 päeva pärast TGF- $\beta$  lisamist (1) ning CD3/CD28-aktiveeritud ja TGF- $\beta$  stimuleeritud rakud (2); CD4+CD25- rakud kasvatatud TGF- $\beta$  juuresolekul (3) ning CD3/CD28-aktiveeritud ja TGF- $\beta$  stimuleeritud rakud (4). **B.** CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude elulemus. **C.** CD25 ekspressioon CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudel. **D.** Foxp3 ekspressioon CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudes.

## 4. Arutelu

Antud uuringu tulemusel leiti, et LPS põhjustab hiire lümfotsüütide aktiveerumise ja proliferatsiooni suurenemise ning mõjutab otseselt lümfotsüütidest sorteeritud CD4+CD25+ Treg rakke. Tsütokiin IL-2 juuresolek oli vajalik CD4+CD25+ rakkude elulemuseks ning suurendas CD25 ekspressiooni ning Foxp3 ekspressiooni LPS-stimuleeritud rakkudel. Sorteeritud CD4+CD25- rakkudest CD4+CD25+ rakkude indutseerimisel tsütokiin TGF- $\beta$  ja CD3/CD28-antikehade juuresolekul suurenes CD25 retseptori ekspressioon, kuid tekkinud CD4+CD25+ rakud ei ekspresseerinud Foxp3.

LPS stimuleeris põrnarakkudest eraldatud lümfotsüütide proliferatsiooni võrreldes stimuleerimata rakkudega. Sorteeritud rakkude korral suurenes nii CD4+CD25+ kui CD4+CD25- rakkude elulemus LPS lisamisel võrreldes stiimulita kasvatatud rakkudega. Saadud andmed on vastavuses varasemate eksperimentidega, kus näidati LPS stimuleerimisel hiire CD4+CD25+ rakkude arvu suurenemine võrreldes stimuleerimata rakkudega (Caramalho et al., 2003). Kuid eksperimentides inimese Treg rakkudega ei mõjutanud LPS lisamine nende rakkude proliferatsiooni (Crellin et al., 2005) ning Treg rakkude aktiveerimisel CD3-antikehaga vähenes Treg rakkude arv (Komai-Koma et al., 2004).

Hiire lümfotsüütide stimuleerimisel LPS suurenes CD4+ ja CD4- rakkude pinnal CD69 ekspressioon, mis on lümfotsüütide varajase aktivatsiooni marker. CD69 ekspressioonitaseme tõus toimus 6-9 h jooksul stimulatsiooni algusest. Lümfotsüütide LPS stimuleerimisel suurenes CD4+ ja CD4- rakkudel CD25 ekspressioon 6-9 h jooksul stimulatsiooni algusest. Saadud tulemused on kooskõlas eelnevate uuringutega, kus näidati, et LPS stimuleerimisel detekteeriti T ja B lümfotsüütide ning NK rakkude pinnal suurenenud CD69 ekspressioon (Brunialti et al., 2002, Castro et al., 1998) ning CD25 ekspressioonitaseme tõus hiire CD4+ ja CD8+ T rakkudel pärast LPS manustamist (Castro et al., 1998). Inimese vererakkudel läbi viidud katsetes on samuti näidatud CD69 ekspressioonitaseme tõusu B rakkudel ning CD4+ ja CD4- (peamiselt CD8+) T rakkudel (Brunialti et al., 2002).

Hiire lümfotsüütide stimuleerimisel erinevate LPS kontsentratsioonidega ilmnes, et juba 2 µg/ml põhjustas CD4<sup>+</sup> ja CD4<sup>-</sup> rakkude aktivatsioonimarkerite CD25 ja CD69 ekspressiooni suurenemist. CD4-CD25<sup>+</sup> rakkude arv lümfotsüütides suurenes märgatavalt, kuid CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rakkude arv LPS kontsentratsiooni edasisel suurendamisel vähenes ja saavutas esialgse taseme. Sellest võib järeldada, et CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rakud on tundlikud juba väga väikeste patogeeni (LPS) kontsentratsioonide suhtes.

IL-2 lisamisel sorteeritud CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rakkudele suurenes rakkude elulemus oluliselt ning rakkude aktivatsioon CD3/CD28 antikehadega suurendas rakkude elulemust veelgi enam. Antud tulemused on kooskõlas eelnevate uuringutega, kus IL-2 juuresolekul jäi ellu 2 korda rohkem rakke võrreldes stimuleerimata rakkudega (Netea et al., 2004). IL-2 soodustas Foxp3 ekspressioonitaseme suurenemist CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rakkudes. CD3/CD28 antikehadega stimuleerimine põhjustas CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rakkudes CD25 ekspressiooni suurenemise, kuid kõik rakud ei ekspresseerinud Foxp3. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> rakkudes soodustas IL-2 juuresolek CD3/CD28 antikehadega aktiveeritud rakkudes CD25 ja Foxp3 ekspressiooni suurenemise. Sellest võib järeldada, et IL-2 selektiivselt reguleerib Foxp3 ekspressiooni eraldatud CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rakkudes ning saadud tulemused on kooskõlas varasemate tulemustega, kus näidati Foxp3 ekspressiooni suurenemist Treg rakkudel IL-2 lisamisel (Zorn et al., 2006). Arvatavasti omasid IL-2 juuresolekul kasvatatud CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rakud supresseerivaid omadusi, sest IL-2 toimetel suurenes Foxp3 positiivsete rakkude hulk, Foxp3 ekspressioon ning CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rakkude arv, mis on kõik olulised CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rakkude funktsionaalse aktiivsuse väljendamiseks (Thornton 2004, de la Rosa 2003).

Antud töös leiti, et IL-2 juuresolekul CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rakkude CD25 ekspressioon ja Foxp3 ekspressioon oli suurem LPS stimuleerimisel võrreldes IL-2 puudumisel kasvatatud ja LPS stimuleeritud rakkudega. LPS stimulatsioon põhjustas CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rakkudel Foxp3 ekspressiooni vähenemise võrreldes stimuleerimata rakkudega. Inimese Treg rakkude stimuleerimisel LPS on leitud, et Foxp3 ekspressioon on vähenenud nendes rakkudes (Crellin et al., 2005, Lewkowicz et al., 2006). Antud töö tulemused näitavad, et IL-2 juuresolekul on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rakud vähem tundlikud LPS toimele.

Arvatakse, et CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> rakud moodustavad CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> rakkude reservuaari inimestel ja hiirtel, sest Foxp3 ekspressioon on detekteeritud madalal tasemel nendes rakkudes ja teatud tingimustes võivad CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> rakud paljuneda ja aktiveeruda. Mitmed



töörühpid on näidanud, et TGF- $\beta$  on võimeline indutseerima CD4+CD25- rakkudel Foxp3 ekspressiooni ning indutseerima CD4+CD25- rakud reguleeritavaks rakkudeks (Chen et al., 2003, Fantini et al., 2004, Liu et al., 2006). Lisaks sellele on näidatud TGF- $\beta$  olulisust Treg rakkude vahendatud supressioonil ning Treg rakkude *in vivo* elulemusel (Huber et al., 2004, Marie et al., 2005). TGF- $\beta$  omab väga erinevaid efekte T rakkude kasvu reguleerimisel, diferentseerumisel, T-rakkude proliferatsiooni inhibeerimisel ning T<sub>H</sub>1 ja T<sub>H</sub>2 rakkude generatsioonil. Lisaks inhibeerivale efektile omab TGF- $\beta$  positiivset rolli CD4+ ja CD8+ Treg rakkude generatsioonil, funktsioonil ja elulemusel. Antud töös vähendas TGF- $\beta$  aktiveeritud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkude elulemust, mis on kooskõlas varem avaldatud andmetega (Chen et al., 2003). TGF- $\beta$  lisamisel on täheldatud CD25 ekspressiooni suurenemist CD4+CD25- rakkudel (Zheng et al., 2007) sarnaselt antud töös leitud. Kahjuks tekkinud CD4+CD25+ rakud ei olnud Treg rakud, sest Foxp3 ekspressioon ei olnud detekteeritav nendes rakkudes. Mitmed töörühpid on aga näidanud, et TGF- $\beta$  on võimeline indutseerima CD4+CD25- rakkudes Foxp3 ekspressiooni (Chen et al., 2003, Fantini et al., 2004, Liu et al., 2006). Erinevus, miks antud töös ei õnnestunud *ex vivo* Treg rakke saada CD4+CD25- eellastest, võis olla tingitud sellest, et kasutati TGF- $\beta$  latentset kompleksi. TGF- $\beta$  latentne kompleks aktiveeriti enne rakkudele lisamist kasutades happega töötlemist, kuid vabanenud aktiivse TGF- $\beta$  homodimeeri võime interakteeruda rakkudega võis olla mõjutatud LAP-peptiidi juuresolekust. Samuti peab arvestama seda, et TGF- $\beta$  ise võib toimida rakkudele nii autokriinselt kui parakriinselt. CD4+CD25+ rakkude stimuleerimisel IL-2 juuresolekul produtseerivad rakud rakumembraaniga seotud TGF- $\beta$  (Zheng et al., 2007), mis omakorda võib avaldada mõju rakkudele.

TLR ekspressioon on detekteeritud erinevatel vererakkudel: APC rakkudel, neutrofiilidel ja epiteeli rakkudel. Seetõttu kasutati antud töös FACS rakusorteerit CD4+CD25+ rakkude ja CD4+CD25- rakkude sorteerimiseks, et garanteerida võimalikult kõrge puhtusastmega rakupopulatsioonid, mis ei sisaldaks APC rakke, mille pinnal ekspresseeritakse TLR retseptoreid suures kontsentratsioonis ja seetõttu võivad segada tulemuste interpreteerimist.

LPS poolt põhjustatud rakkude aktivatsioon võib sõltuda rakkude töötlemisel kasutatud reagentidest. Tulemused võivad eelkõige sõltuda LPS lähtematerjalist ja preparaadi puhtusastmest. Antud töös kasutati LPS, mis oli eraldatud bakterist *S.*

*typhimurium*. Erinevate LPS kasutamisel enamus uuringuid väidab, et T rakud ei ole tundlikud LPS suhtes (Crellin et al., 2005, Komai-Koma et al., 2004, Suttmüller et al., 2006a). *S. typhimurium*'i LPS on siiani ainus, mis on võimeline aktiveerima CD4+CD25+ rakke hiirel (Caramalho 2003). Lisaks LPS preparaadi omadustele on näidatud, et rakkude aktivatsioonimarkeri CD69 ekspressioon LPS-stimuleeritud lümfotsüütide pinnal sõltub kasutatavast antikoagulandist, sest hepariniseeritud vererakkudes oli CD69 ekspressioon enam väljendunud kui vererakkudel, millele oli lisatud EDTA (Brunialti et al., 2002). Antud töös kasutati lümfotsüütide eraldamisel hiire põrnarakkudest BSA-PBS puhverlahust, mis sisaldas 2 mM EDTA, kuid arvatavasti ei avaldanud rakkude lühiajaline kokkupuude EDTA lahusega olulist toimet, kuna CD69 ekspressiooni suurenemine CD4- ja CD4+ rakkudel oli selgelt väljendunud ning rakkude kasvatamisel EDTA ei kasutatud. Antud töö tulemuste alusel võib järeldada, et infektsiooni korral patogeenide (LPS jt) toimel Treg rakud ja CD4+CD25- rakud prolifereeruvad, kusjuures Treg rakkude paljunemine on põhjustatud otsesest TLR ligandi toimest. CD4+CD25- rakud samuti prolifereeruvad ning produtseerivad IL-2. Infektsiooni ajal on patogeeni-spetsiifiliste antigeenide esitlemine primaarne. Kui patogeen kõrvaldatakse ja infektsioon väheneb, siis Treg rakud taastavad oma supresseerivad omadused ja on võimelised osa võtma immuunvastuse reguleerimisest ning organismi enda spetsiifiliste antigeenide esitlemisest põletiku tingimustes. Kuidas kroonilise põletiku tingimustes ja infektsioonide korral kaasneb autoimmuunhaiguste teke, vajab kindlasti edasist põhjalikku uurimist.

## Kokkuvõte

CD4+CD25+ T regulatoorsed rakud (Treg) on olulised immuussüsteemi homeostaasi tagamisel, supresseerides organismi enda antigeenide spetsiifilisi immuunrakke ning osaledes patogeenidega seotud immuunvastuse kontrollimisel. Treg rakkudel konstitutiivselt ekspresseeruvad kemokiini retseptorid võimaldavad Treg rakkudel migreeruda infektsiooni varajases staadiumis põletikukoldesse. Treg rakkude osalemine põletikukoldes toimuvates protsessides ei ole siiani veel detailselt teada. Hiljuti kirjeldati Treg rakkude pinnal patogeene äratundvad retseptorite ekspressioon. Hiire Treg rakkudel on leitud funktsionaalsed TLR4, TLR5 ja TLR8 retseptorid. Seega TLR4 retseptori ligand lipopolüsahhariid (LPS) võib mõjutada Treg rakke nii otseselt kui kaudselt teiste rakkude kaudu.

CD4+CD25+ Treg rakud moodustavad 5-10 % CD4+ lümfotsüütidest. Nende rakkude *in vivo* ja *in vitro* elulemus ning homeostaas sõltub tsütokiinist IL-2, mida produtseeritakse efektorrakkude poolt. Treg rakkude kõige spetsiifilisemaks tunnuseks on transkriptsioonifaktor Foxp3 ekspressioon, mis on vajalik Treg rakkude arengul ning funktsioneerimisel. Treg rakkude supresseerivad omadused sõltuvad arvatavasti rakk-rakk interaktsioonist ning vähemal määral Treg rakkude poolt produtseeritavate tsütokiinide TGF- $\beta$  ja IL-10 toimest efektorrakkudele. *In vitro* uuringus on näidatud, et TGF- $\beta$  lisamine hiire CD4+CD25- rakkudele indutseeris Treg rakkude tekke, sest indutseeriti CD4+ rakkudes CD25 ekspressioon ja Foxp3 ekspressioon.

Antud töös uuriti Treg spetsiifilise TLR4 retseptori ligandi LPS ning tsütokiinide TGF- $\beta$  ja IL-2 mõju hiire lümfotsüütidele ning hiire lümfotsüütidest eraldatud CD4+CD25+ ja CD4+CD25- rakkudele. LPS põhjustas hiire lümfotsüütide aktiveerumise ja proliferatsiooni suurenemise ning stimuleeris otseselt lümfotsüütidest sorteeritud CD4+CD25+ Treg rakke. Tsütokiin IL-2 lisamisel suurenes CD4+CD25+ rakkude elulemus. LPS ja IL-2 koostoimel suurenes CD4+CD25+ rakkudel CD25 retseptori ning Foxp3 ekspressioon võrreldes ainult LPS-stimuleeritud rakkudega. Treg rakkude eellasrakkude CD4+CD25- rakkude indutseerimisel TGF- $\beta$  ja CD3/CD28-antikehade

juuresolekul suurenes CD25 retseptori ekspressioon rakkudel, kuid tekkinud CD4+CD25+ rakud ei ekspresseerinud Foxp3.

Antud töö tulemustest võib järeldada, et infektsiooni korral patogeenide (LPS jt) toimel Treg rakud ja CD4+CD25- rakud aktiveeruvad ja prolifereeruvad, kusjuures Treg rakkude aktivatsioon on põhjustatud otsesest TLR ligandi toimest. Tsütokiin IL-2, mida produtseeritakse aktiveeritud CD4+CD25- rakkude poolt, on vajalik Treg rakkude elulemuseks ning suurendab Treg rakkude aktivatsiooni LPS toimel. Treg rakkude genereerimiseks CD4+CD25- eellasrakkudest kasutatud TGF- $\beta$  ja CD3/CD28 antikehadega aktivatsioon ei põhjustanud funktsionaalsete Treg rakkude teket.

## Summary

### **“Effect of lipopolysaccharide and interleukin-2 on murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- cells”**

CD4+CD25+ T regulatory cells (Treg) play a central role in prevention of autoimmune reactions and in the suppression of immune responses against pathogens. The Treg constitutively express chemokine receptors, which guide the rapid migration of Treg cells to inflammatory sites. How the Treg function in the host inflammatory response is not fully discovered. Recently the expression of pathogen recognition receptors (TLR) has been found on Treg cells. Treg cells possess on the cell surface functional TLR4, TLR5 and TLR8 receptors, which may have influence on Treg cells function directly or indirectly by the help with other cells.

CD4+CD25+ cells constitute 5-10 % of CD4+ lymphocytes. The survival of Treg cells *in vivo* and *in vitro* depends on the cytokine IL-2, which is produced by the effector cells. The most specific marker for Treg cells is the expression of transcription factor Foxp3, which has an important role in the development and function of Treg cells. The suppressive effect of Treg cells is obviously mediated by cell-cell interaction rather than the effect of TGF- $\beta$  and IL-10 on the effector cells. *In vitro* experiments have shown that the addition of TGF- $\beta$  on CD4+CD25- cells caused the generation of Treg cells characterized with the expressions of CD25 receptor and of Foxp3.

In this study we investigated how the TLR4-receptor-specific ligand LPS and cytokines TGF- $\beta$  and IL-2 influence murine lymphocytes, sorted CD4+CD25+ cells, and CD4+CD25- cells. We found that LPS enhanced proliferation and activation of lymphocytes and directly stimulated sorted CD4+CD25+ Treg cells. The presence of IL-2 resulted in higher survival rate of CD4+CD25+ cells. Compared to LPS-stimulated Treg cells, the expression of CD25 receptor and Foxp3 increased in the presence of IL-2 and LPS. The stimulation of CD4+CD25- cells with TGF- $\beta$  and with CD3/CD28 antibodies enhanced the expression of CD25 receptor on these CD4+CD25- cells, but generated CD4+CD25+ cells did not express Foxp3.

In conclusion, the results on this study confirm that during the infection with pathogens (LPS), the Treg and CD4+CD25<sup>-</sup> cells proliferate and become activated as a direct response of LPS on TLR receptors on cell surface. Cytokine IL-2, produced by activated effector cells, is important for the survival of Treg cells enhances the activation of Treg cells by LPS. The generation of Treg cells from CD4+CD25<sup>-</sup> cells as Treg precursors needs more special conditions than the stimulation with TGF- $\beta$  and activation of cells with CD3/CD38 antibodies

## Kirjandus

- Akira, S., and H. Hemmi. 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 85: 85-95.
- Almeida, A. R., N. Legrand, M. Papiernik, and A. A. Freitas. 2002. Homeostasis of peripheral CD4<sup>+</sup> T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4<sup>+</sup> T cell numbers. *J Immunol* 169: 4850-60.
- Antov, A., L. Yang, M. Vig, D. Baltimore, and L. Van Parijs. 2003. Essential role for STAT5 signaling in CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance. *J Immunol* 171: 3435-41.
- Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 184: 387-96.
- Bacchetta, R., L. Passerini, E. Gambineri, M. Dai, S. E. Allan, L. Perroni, F. Dagna-Bricarelli, C. Sartirana, S. Matthes-Martin, A. Lawitschka, C. Azzari, S. F. Ziegler, M. K. Levings, and M. G. Roncarolo. 2006. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest* 116: 1713-22.
- Bach, J. F. 2003. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 3: 189-98.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman, and D. A. Hafler. 2001. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167: 1245-53.
- Beyer, M., and J. L. Schultze. 2006. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 108: 804-11.
- Brunialti, M. K., E. G. Kallas, M. Freudenberg, C. Galanos, and R. Salomao. 2002. Influence of EDTA and heparin on lipopolysaccharide binding and cell activation, evaluated at single-cell level in whole blood. *Cytometry* 50: 14-8.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepers, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27: 68-73.
- Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury, and J. Demengeot. 2003. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 197: 403-11.
- Caroff, M., and D. Karibian. 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* 338: 2431-47.

- Castro, A., V. Bemer, A. Nobrega, A. Coutinho, and P. Truffa-Bachi. 1998. Administration to mouse of endotoxin from gram-negative bacteria leads to activation and apoptosis of T lymphocytes. *Eur J Immunol* 28: 488-95.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198: 1875-86.
- Coenen, J. J., H. J. Koenen, E. van Rijssen, L. Boon, I. Joosten, and L. B. Hilbrands. 2006. CTLA-4 engagement and regulatory CD4+CD25+ T cells independently control CD8+-mediated responses under costimulation blockade. *J Immunol* 176: 5240-6.
- Collins, A. V., D. W. Brodie, R. J. Gilbert, A. Iaboni, R. Manso-Sancho, B. Walse, D. I. Stuart, P. A. van der Merwe, and S. J. Davis. 2002. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17: 201-10.
- Crellin, N. K., R. V. Garcia, O. Hadisfar, S. E. Allan, T. S. Steiner, and M. K. Levings. 2005. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 175: 8051-9.
- de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34: 2480-8.
- Dennehy, K. M., F. Elias, G. Zeder-Lutz, X. Ding, D. Altschuh, F. Luhder, and T. Hunig. 2006. Cutting edge: monovalency of CD28 maintains the antigen dependence of T cell costimulatory responses. *J Immunol* 176: 5725-9.
- Fantini, M. C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P. R. Galle, and M. F. Neurath. 2004. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172: 5149-53.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6: 1142-51.
- Gambineri, E., T. R. Torgerson, and H. D. Ochs. 2003. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 15: 430-5.
- Gelman, A. E., J. Zhang, Y. Choi, and L. A. Turka. 2004. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol* 172: 6065-73.
- Gershon, R. K., and K. Kondo. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21: 903-14.



- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-61.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168: 4531-7.
- Huang, X., J. Zhu, and Y. Yang. 2005. Protection against autoimmunity in nonlymphopenic hosts by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is antigen-specific and requires IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* 175: 4283-91.
- Huber, S., C. Schramm, H. A. Lehr, A. Mann, S. Schmitt, C. Becker, M. Protschka, P. R. Galle, M. F. Neurath, and M. Blessing. 2004. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 173: 6526-31.
- Kasow, K. A., X. Chen, J. Knowles, D. Wichlan, R. Handgretinger, and J. M. Riberdy. 2004. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells share equally complex and comparable repertoires with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> counterparts. *J Immunol* 172: 6123-8.
- Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337-42.
- Komai-Koma, M., L. Jones, G. S. Ogg, D. Xu, and F. Y. Liew. 2004. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3029-34.
- Levings, M. K., R. Bacchetta, U. Schulz, and M. G. Roncarolo. 2002. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 129: 263-76.
- Lewkowicz, P., N. Lewkowicz, A. Sasiak, and H. Tchorzewski. 2006. Lipopolysaccharide-activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol* 177: 7155-63.
- Lim, H. W., P. Hillsamer, and C. H. Kim. 2004. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J Clin Invest* 114: 1640-9.
- Liu, Y., S. Amarnath, and W. Chen. 2006. Requirement of CD28 signaling in homeostasis/survival of TGF-beta converted CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs from thymic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> single positive T cells. *Transplantation* 82: 953-64.

- Malek, T. R., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli, and L. Kong. 2002. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17: 167-78.
- Marie, J. C., J. J. Letterio, M. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201: 1061-7.
- Nakamura, K., A. Kitani, I. Fuss, A. Pedersen, N. Harada, H. Nawata, and W. Strober. 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 172: 834-42.
- Netea, M. G., R. Suttmuller, C. Hermann, C. A. Van der Graaf, J. W. Van der Meer, J. H. van Krieken, T. Hartung, G. Adema, and B. J. Kullberg. 2004. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 172: 3712-8.
- Nishizuka, Y., and T. Sakakura. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166: 753-5.
- Ochando, J. C., A. C. Yopp, Y. Yang, A. Garin, Y. Li, P. Boros, J. Llodra, Y. Ding, S. A. Lira, N. R. Krieger, and J. S. Bromberg. 2005. Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 174: 6993-7005.
- Papiernik, M., M. L. de Moraes, C. Pontoux, F. Vasseur, and C. Penit. 1998. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* 10: 371-8.
- Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, A. M. Thornton, R. S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara, and E. M. Shevach. 2002. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 196: 237-46.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-64.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J. A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12: 431-40.
- Shevach, E. M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2: 389-400.

- Shevach, E. M. 2006. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25: 195-201.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3: 135-42.
- Stephens, G. L., R. S. McHugh, M. J. Whitters, D. A. Young, D. Luxenberg, B. M. Carreno, M. Collins, and E. M. Shevach. 2004. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 173: 5008-20.
- Suffia, I., S. K. Reckling, G. Salay, and Y. Belkaid. 2005. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of Leishmania major infection. *J Immunol* 174: 5444-55.
- Sutmoller, R. P., M. H. den Brok, M. Kramer, E. J. Bennink, L. W. Toonen, B. J. Kullberg, L. A. Joosten, S. Akira, M. G. Netea, and G. J. Adema. 2006a. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 116: 485-94.
- Sutmoller, R. P., M. E. Morgan, M. G. Netea, O. Grauer, and G. J. Adema. 2006b. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol* 27: 387-93.
- Zhao, D. M., A. M. Thornton, R. J. DiPaolo, and E. M. Shevach. 2006. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107: 3925-32.
- Zheng, S. G., J. Wang, P. Wang, J. D. Gray, and D. A. Horwitz. 2007. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* 178: 2018-27.
- Zorn, E., E. A. Nelson, M. Mohseni, F. Porcheray, H. Kim, D. Litsa, R. Bellucci, E. Raderschall, C. Canning, R. J. Soiffer, D. A. Frank, and J. Ritz. 2006. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 108: 1571-9.
- Tai, X., M. Cowan, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2005. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 6: 152-62.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192: 303-10.
- Takeda, K., and S. Akira. 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16: 3-9.

- Tang, Q., J. Y. Adams, A. J. Tooley, M. Bi, B. T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R. M. Locksley, M. F. Krummel, and J. A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 7: 83-92.
- Thornton, A. M., C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach. 2004. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol* 34: 366-76.
- Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188: 287-96.
- Triantafilou, M., and K. Triantafilou. 2004. Sepsis: molecular mechanisms underlying lipopolysaccharide recognition. *Expert Rev Mol Med* 2004: 1-18.
- Wei, S., I. Kryczek, and W. Zou. 2006. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* 108: 426-31.
- Weiner, H. L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182: 207-14.
- Wing, K., A. Ekmark, H. Karlsson, A. Rudin, and E. Suri-Payer. 2002. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 106: 190-9.

## **Tänuavaldused**

Suur tänu juhendaja Ade Kallasele juhendamise, nõuannete ja kõikvõimaliku abi eest.

Tänan vivaariumi juhatajat Sulev Kuuset igakülgse abi eest hiire põrnade eraldamisel. Suur aitäh ka kõikidele teistele toredatele rakubioloogia õppetooli inimestele.

Töö teostamine finantseeriti grantidest ETF5454, ETF6459 ja SF0182532s03.